

(43) 国際公開日
2004年1月22日 (22.01.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/008141 A1

(51) 国際特許分類: G01N 33/53, 33/15

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/007501

(22) 国際出願日: 2003年6月12日 (12.06.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(36) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権主張: 2002年7月15日 (15.07.2002) JP
特願2002-205554

(71) 出願人(英名) 武田薬品工業株式会社 (TAKEEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) (JP/PP): 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号 Osaka (JP)

(72) 発明者(英名) および

(73) 発明者(英名) 出願人(英名) についてのみ: 日沼 州司 (HINUMA, Shuji) (JP/PP): 〒305-0821 茨城県つくば市 春日1丁目7-8-1 402 (Hinata) (JP), 藤井 亮 (FUJII, Ryo) (JP/PP): 〒305-0821 茨城県つくば市 春日2丁目3-3-16 (Hinata) (JP), 飯沼 征雄 (HAKAIDA, Junesuke) (JP/PP): 〒305-0846 茨城県つくば市 東2丁目1-4-5-201 (Hinata) (JP), 細谷 昌樹 (HOSOGAYA, Masaki) (JP/PP): 〒300-0007 茨城県土浦市 坂巻1丁目7-1-8-3 (Hinata) (JP), 藤 正明

(81) 指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EG, ES, FI, GB, GR, GT, HK, HN, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, NI, NO, NZ, OM, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SI, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(広域): ARIPO特許 (GI), GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW, ユーロパ特許 (AM, AZ, BY, BG, CZ, DE, DK, EE, FI, FR, GB, GR, HU, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, NI, NO, NZ, OM, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SI, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW).
補付公開番号:
— 国際調査報告
2文字コード及び他の略語については、定期発行される各データベースの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(4) Title: NOVEL SCREENING METHOD

(54) 発明の名称: 新規スクリーニング方法

(57) Abstract: Using a G protein-coupled receptor protein having an amino acid sequence which is the same or substantially the same as an amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:19 or SEQ ID NO:21 or its salt and a human-like peptide, a compound or a salt thereof capable of changing the binding properties of the above receptor protein or its salt to the human-like peptide can be efficiently screened.

WO 2004/008141

(57) 要約: 配列番号1、配列番号17、配列番号19または配列番号21で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは實質的に同一のアミノ酸配列を有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩およびhuman-like peptideを用いることにより、該レセプター蛋白質またはその塩とhuman-like peptideとの結合性を変化させる化合物またはその塩を効率的にスクリーニングすることができ。

明 細 書

新規スクリーニング方法

5

技術分野

本発明は、humanin類似ペプチドとG蛋白質共役型レセプター蛋白質 (FPR1またはFPR2) とを用いるアッセイ・プラットフォームのスクリーニング方法などに関する。

10

背景技術

多くのホルモンや神経伝達物質などの生理活性物質は、細胞膜に存在する特異的なレセプター蛋白質を通じて生体の機能を調節している。これらのレセプター蛋白質のうち多くは共役しているguanine nucleotide-binding protein (以下、G蛋白質と略称する場合がある) の活性化を通じて細胞内のシグナル伝達を行ない、また、7個の膜貫通領域を有する共通した構造をもっていることから、G蛋白質共役型レセプター蛋白質あるいは7回膜貫通型レセプター蛋白質 (7TMR) と総称される。

15

G蛋白質共役型レセプター蛋白質は生体の細胞や臓器の各機能細胞表面に存在し、それら細胞や臓器の機能を調節する分子、例えば、ホルモン、神経伝達物質および生理活性物質等の標的として生理的に重要な役割を担っている。レセプターは生理活性物質との結合を介してシグナルを細胞内に伝達し、このシグナルにより細胞の賦活や抑制といった種々の反応が惹起される。

20

各種生体の細胞や臓器の内の複雑な機能を調節する物質と、その特異的なレセプター蛋白質、特にG蛋白質共役型レセプター蛋白質との関係を明らかにすることは、各種生体の細胞や臓器の機能を解明し、それら機能と密接に関連した医薬品開発に非常に重要な手段を提供することとなる。

25

例えば、生体の種々の器官では、多くのホルモン、ホルモン様物質、神経伝達物質あるいは生理活性物質による調節のもとで生理的な機能の調節が行なわれている。特に、生理活性物質は生体内の様々な部位に存在し、それぞれに對

応するレセプター蛋白質を通してその生理機能の調節を行っている。生体内には未知のホルモンや神経伝達物質その他の生理活性物質も多く、これらのレセプター蛋白質の構造に関しても、これまで報告されていないものが多い。さらに、既知のレセプター蛋白質においてもサブタイプが存在するかどうかについても分かっていないものが多い。

生体における複雑な機能を調節する物質と、その特異的レセプター蛋白質との関係を明らかにすることは、医薬品開発に非常に重要な手段である。また、レセプター蛋白質に対するアゴニスト、アンタゴニストを効率よくスクリーニングし、医薬品を開発するためには、生体内で発現しているレセプター蛋白質の遺伝子の機能を解明し、それらを適当な発現系で発現させることが必要であった。

近年、生体内で発現している遺伝子を解析する手段として、cDNAの配列をランダムに解析する研究が活発に行なわれており、このようにして得られたcDNAの断片配列がExpressed Sequence Tag (EST) としてデータベースに登録され、公開されている。しかし、多くのESTは配列情報のみであり、その機能を推定することは困難である。

オーファング蛋白質共役型レセプター蛋白質の1つとして、ヒトFRL1が知られている (J. Biol. Chem. 267(11), 7637-7643(1992))。FRL1のアゴニストとしては、これまでにバクテリア由来のfMLF、HIV由来のgp41あるいはgp120の部分ペプチド、アリオンの部分ペプチド、内因性の物質としてはAB42、Annexin Iの部分ペプチド、Acute phase protein、hCAP18、NADH dehydrogenaseなどの部分ペプチド、脂質であるリボキシンA4などが報告されている (Immunopharmacol. 2巻、1-13頁、2002年)。

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease) は進行性痴呆および認知能力の失調を伴う神経変性疾患の代表的なものであるが、これまでに効果的な治療法は見出されていない。アルツハイマー病は高齢化社会を迎えつつある現在において最も重要な疾患の一つであることは言うまでもなくその治療薬の開発は医療経済的にも極めて大きな意義を有する。

最近、橋本らは、アルツハイマー病患者の後頭葉に病変が少くないことに着目して「デス・トラップ」法 (L. D'Adamio, Semin. Immunol., 9巻、17-23頁、1997年) により家族性アルツハイマー病の原因遺伝子を導入した神経細胞の細胞死を抑制する遺伝子を変換よりクローニングした (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98巻、6336-6341頁、2001年)。この遺伝子は、human (WO 01/21787) と名付けられた24残基からなるペプチドをコードしており、合成humaninペプチドは、家族性アルツハイマー病遺伝子を導入した神経細胞死を抑制したのみならず、アルツハイマー病の原因である可能性があると考えられているβアミロイド添加によって誘導される神経細胞死をも抑制した。humaninは細胞外に分泌され、神経細胞に作用して細胞死を抑制するものと考えられているが、その受容体は明らかにされていないかった。

AB42がFRL1のアゴニストであり、FRL1を介して毒性を示すこと、および、アルツハイマー病の特徴病変である老人斑にFRL1が集積していることが報告されている。これらのことより、FRL1とアルツハイマー病で見られる炎症反応との関連性が示唆されている (The Journal of Neuroscience, 2001, Vol. 21 RC123)。

AB42がFRL1を介してマクロファージ細胞内に取り込まれることにより、繊維素凝集 (アミロイド線沈着) を形成することも報告されている (The FASEB Journal, Vol. 15 November 2001, 2454-2462)。

さらに、オーファング蛋白質共役型レセプター蛋白質の1つとして、ヒトFRL2が知られている (Genomics 13 (2), 437-440 (1992))。

ヒトFRL2とfMLF (formyl-Met-Leu-Phe) のレセプターであるFRL1との相同性が大きいことが、ヒトFRL2はfMLFと反応しないことが報告されている。また、FRL2は単球に発現が認められたが、FRL1およびFRL1の発現が認められた好中球には発現が認められなかったことが報告されている (Biochem. Biophys. Res. Commun., 1994 May 30;201(1):174-9)。

W-Petide (Trp-Lys-Tyr-Met-Val-Met-NH₂) がFRL1および

PRL2のアミノ酸であり、FPR L2が単独で高発現していることが報告されている (J. Biol. Chem. 276(24), 21585-21593(2001))。

ヘリコバクターピロリ由来ペプチドHP (2-20) がFPR L2のアミノ酸であり、FPR L1/FPR L2を介して単球を活性化することが報告されている (J. Clin. Invest., 2001 Oct;108(8):1221-8)。

抗原提示細胞の一種である樹状細胞 (成熟型、未成熟型) に機能を保持したFPR L2が発現しており、樹状細胞の trafficking (輸送) を制御しているのではないかと報告されている。 (J. Leukoc. Biol., 2002 Sep;72(3):598-607)。

ラット型humaninが神経保護活性を有することが記載されている (The FASEB Journal, Vol.16, August 2002, 1331-1333)。

従来、G蛋白質共役型レセプターと生理活性物質 (すなわち、リガンド) との結合を阻害する物質や、結合して生理活性物質 (すなわち、リガンド) と同様なシグナル伝達を引き起こす物質は、これらレセプターの特異的なアミノ酸またはアミノ酸として、生体機能を調節する医薬品として活用されてきた。従って、G蛋白質共役型レセプター-蛋白質の特異的リガンドを決定することは、医薬品開発の標的ともなりうるアミノ酸、アミノ酸を見出す際に、非常に重要な手段となる。

しかし、現時点でもなお、機能未知のG蛋白質共役型レセプター、また対応するリガンドが同定されていない、いわゆるオーファンレセプターが多数存在しており、G蛋白質共役型レセプターのリガンド探索および機能解明が切望されている。

G蛋白質共役型レセプターは、そのシグナル伝達作用を指標とする、新たな生理活性物質 (すなわち、リガンド) の探索、また、該レセプターに対するアミノ酸またはアミノ酸の探索に有用である。これら該レセプターに対するリガンド、アミノ酸またはアミノ酸などは、G蛋白質共役型レセプターの機能不全や機能亢進に関連する疾患の予防・治療薬や診断薬として活用することが期待できる。

さらにまた、G蛋白質共役型レセプターの遺伝子変異に基づき、生体での該

レセプターの機能の低下または昂進が、何らかの疾患の原因となっている場合も多い。この場合には、該レセプターに対するアミノ酸またはアミノ酸の投与だけでなく、該レセプター遺伝子の生体内 (またはある特定の臓器) への導入や、該レセプター遺伝子に対するアンチセンス核酸の導入による、遺伝子治療に適用することもできる。この場合には該レセプターの塩基配列は遺伝子上の欠失や変異の有無を調べるために必要不可欠な情報であり、該レセプターの遺伝子は、該レセプターの機能不全に関連する疾患の予防・治療薬や診断薬に応用することもできる。

本発明は、humanin類似ペプチドとFPR L1またはFPR L2との結合性を変化させる化合物 (アミノ酸、アミノ酸) またはその塩のスクリーニング方法、該スクリーニング用キット、該スクリーニング方法もしくはスクリーニングキットを用いて得られるhumanin類似ペプチドとFPR L1またはFPR L2との結合性を変化させる化合物 (アミノ酸、アミノ酸) またはその塩、およびhumanin類似ペプチドとFPR L1またはFPR L2との結合性を変化させる化合物 (アミノ酸、アミノ酸) を含有してなる医薬品などを提供することを目的とする。

発明の開示

本発明者らは、上記の問題を解決するために、鋭意研究を重ねた結果、新規なhumanin類似ペプチドまたはその塩がFPR L1のリガンドであることを見出した。本発明者らは、これらの知見に基づいて、さらに研究を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、

(1) (1) 配列番号: 1 (ヒトFPR L1)、配列番号: 17 (ラットFPR L1)、配列番号: 19 (マウスFPR L2) または配列番号: 21 (ヒトFPR L2) で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター-蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩および (2) humanin類似ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする該レセプター-蛋白質またはその塩とhumanin類似ペプチドま

たはその塩との結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(2) humanin類似ペプチドが、

(1) 配列番号：6で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩、または

(2) 配列番号：6で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列中の連続する6～20個のアミノ酸からなるペプチドまたはその塩である上記 (1) 記載のスクリーニング方法、

(3) humanin類似ペプチドが、

(1) a) 配列番号：6で表されるアミノ酸配列、b) 配列番号：6で表されるアミノ酸配列中の1～10個のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、c) 配列番号：6で表されるアミノ酸配列に1～10個のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、d) 配列番号：6で表されるアミノ酸配列中の1～5個のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、またはe) これらの欠失・付加・置換を組み合わせたアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはその塩、または

(2) a) 配列番号：6で表されるアミノ酸配列の第19番目～24番目、第5番目～24番目、第1番目～20番目、第5番目～20番目、第1番目～21番目、もしくは第5番目～21番目のアミノ酸配列、b) 該アミノ酸配列中の1～6個のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、c) 該アミノ酸配列中の1～6個のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、d) 該アミノ酸配列中の1～6個のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、e) またはこれらの欠失・付加・置換を組み合わせたアミノ酸配列からなり、アミノ酸の数が6～20個であるペプチド (ただし、配列番号：11または配列番号：12で表されるアミノ酸配列の第19番目～24番目、第5番目～24番目、第1番目～20番目、第5番目～20番目、第1番目～21番目または第5番目～21番目のアミノ酸配列からなるペプチドを除く) またはその塩である上記 (1) 記載のスクリーニング方法、

(4) humanin類似ペプチドが、

(1) 配列番号：6で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはその

塩、または

(2) 配列番号：6で表されるアミノ酸配列の第19番目～24番目、第5番目～24番目、第1番目～20番目、第5番目～20番目、第1番目～21番目、もしくは第5番目～21番目のアミノ酸配列からなるペプチドまたはその塩である上記 (1) 記載のスクリーニング方法、

(5) (1) 配列番号：1、配列番号：17、配列番号：19または配列番号：21で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩および (2) humanin類似ペプチドを含有することを特徴とする該レセプター蛋白質またはその塩とhumanin類似ペプチドまたはその塩との結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物またはその塩のスクリーニングキット、

(6) 上記 (1) 記載のスクリーニング方法または上記 (5) 記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、humanin類似ペプチドまたはその塩と配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物またはその塩、

(7) アゴニストである上記 (6) 記載の化合物、

(8) アンタゴニストである上記 (6) 記載の化合物、

(9) humanin類似ペプチドまたはその塩と配列番号：1、配列番号：17、配列番号：19または配列番号：21で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬、

(10) 上記 (7) 記載のアゴニストを含有してなる神経変性疾患もしくは脳機能障害の予防・治療剤、

(11) アルツハイマー病、パーキンソン病、クローン症、筋萎縮性側索硬化症、アミオノ病、クローンフェルトーヤコフ病、ハンチントン病、糖尿病性ニユーロパチー、多発性硬化症、脳梗塞、脳出血、クモ膜下出血、虚血性脳疾患、

硬膜外血腫または硬膜下血腫の予防・治療剤である上記〔10〕記載の予防・治療剤、

〔12〕上記〔7〕記載のアミノストを含有してなる細胞死抑制剤、

〔13〕（1）配列番号：1、配列番号：17、配列番号：19または配列番号：21で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白共役型セプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩および（2）humanin類似ペプチドまたはその塩と該セプター蛋白質またはその塩との結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物またはその塩を用いることを特徴とする該セプター蛋白質またはその塩に対するアミノストまたはアプタミストのスクリーニング方法、

〔14〕哺乳動物に対して、上記〔7〕記載のアミノストの有効量を投与することを特徴とする（i）神経変性疾患もしくは脳機能障害の予防・治療方法、（ii）アルツハイマー病、パーキンソン病、タウン症、筋萎縮性側索硬化症、フリオソ病、クロイツフェルト・ヤコブ病、ハンチントン舞踏病、糖尿病性ニューロパチー、多発性硬化症、脳梗塞、脳出血、クモ膜下出血、虚血性脳疾患、硬膜外血腫または硬膜下血腫の予防・治療方法または（iii）細胞死抑制方法、および

〔15〕（i）神経変性疾患もしくは脳機能障害の予防・治療剤、（ii）アルツハイマー病、パーキンソン病、タウン症、筋萎縮性側索硬化症、フリオソ病、クロイツフェルト・ヤコブ病、ハンチントン舞踏病、糖尿病性ニューロパチー、多発性硬化症、脳梗塞、脳出血、クモ膜下出血、虚血性脳疾患、硬膜外血腫または硬膜下血腫の予防・治療剤または（iii）細胞死抑制剤を製造するための上記〔7〕記載のアミノストの使用を提供する。

さらに、本発明は、

〔16〕（i）配列番号：1、配列番号：17、配列番号：19または配列番号：21で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするG蛋白共役型セプター蛋白質（以下、FPR L1/FPR L2と略記する）、その部分ペプチドまたはその塩と、humanin類似ペプチドまたはその塩とを接触させた場合と、（ii）FPR L1/

FPR L2、その部分ペプチドまたはその塩と、humanin類似ペプチドまたはその塩および試験化合物とを接触させた場合との比較を行なうことを特徴とする上記〔1〕記載のスクリーニング方法、

〔17〕（i）標識したhumanin類似ペプチドまたはその塩をFPR L1/FPR L2、その部分ペプチドまたはその塩に接触させた場合と、（ii）標識したhumanin類似ペプチドまたはその塩および試験化合物をFPR L1/FPR L2、その部分ペプチドまたはその塩に接触させた場合における、標識したhumanin類似ペプチドまたはその塩のFPR L1/FPR L2、その部分ペプチドまたはその塩に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする上記〔1〕記載のスクリーニング方法、

〔18〕（i）標識したhumanin類似ペプチドまたはその塩をFPR L1/FPR L2を含有する細胞に接触させた場合と、（ii）標識したhumanin類似ペプチドまたはその塩および試験化合物をFPR L1/FPR L2を含有する細胞に接触させた場合における、標識したhumanin類似ペプチドまたはその塩の該細胞に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする上記〔1〕記載のスクリーニング方法、

〔19〕（i）標識したhumanin類似ペプチドまたはその塩をFPR L1/FPR L2を含有する細胞の膜面分に接触させた場合と、（ii）標識したhumanin類似ペプチドまたはその塩および試験化合物をFPR L1/FPR L2を含有する細胞の膜面分に接触させた場合における、標識したhumanin類似ペプチドまたはその塩の該細胞の膜面分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする上記〔1〕記載のスクリーニング方法、

〔20〕（i）標識したhumanin類似ペプチドまたはその塩を、FPR L1/FPR L2をコードするDNAを含有するDNAを含有する組換えベクターで形質転換した形質転換体を培養することによって当該形質転換体の細胞膜に発現したFPR L1/FPR L2に接触させた場合と、（ii）標識したhumanin類似ペプチドまたはその塩および試験化合物を当該形質転換体の細胞膜に発現したFPR L1/FPR L2に接触させた場合における、標識したhumanin類似ペプチドまたはその塩のFPR L1/FPR L2に対す

10

る結合量を測定し、比較することを特徴とする上記 (1) 記載のスクリーニング方法、

(21) (i) FPR L1/FPR L2を活性化する化合物またはその塩をFPR L1/FPR L2を含有する細胞に接触させた場合と、(ii) FPR L1/FPR L2を活性化する化合物またはその塩および試験化合物をFPR L1/FPR L2を含有する細胞に接触させた場合における、FPR L1/FPR L2を介した細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とする上記 (1) 記載のスクリーニング方法、

(22) FPR L1/FPR L2を活性化する化合物またはその塩を、FPR L1/FPR L2をコードするDNAを含有する組換えベクターで形質転換した形質転換体を培養することによって当該形質転換体の細胞膜に発現したFPR L1/FPR L2に接触させた場合と、FPR L1/FPR L2を活性化する化合物またはその塩および試験化合物を当該形質転換体の細胞膜に発現したFPR L1/FPR L2に接触させた場合における、FPR L1/FPR L2を介する細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とする上記 (1) 記載のスクリーニング方法、

(23) FPR L1/FPR L2を活性化する化合物がhuman in類似ベクターである上記 (21) または (22) 記載のスクリーニング方法、

(24) FPR L1/FPR L2を含有する細胞またはその膜面分を含有することを特徴とする上記 (5) 記載のスクリーニングキット、および

(25) FPR L1/FPR L2をコードするDNAを含有するDNAを含有する組換えベクターで形質転換した形質転換体を培養することによって当該形質転換体の細胞膜に発現したFPR L1/FPR L2を含有することを特徴とする上記 (5) 記載のスクリーニングキット等を提供する。

25

図面の簡単な説明

図1は各種濃度のhuman in類似ベクターHN3 (配列番号: 6) によるラット副腎髄質由来褐色細胞腫細胞PC12hに対するグルタミン酸脱羧細胞死抑制活性を示す。細胞の生存率は、グルタミン酸無添加区を100%とした

11

ときの比率によって表わした。*はhuman in類似ベクターHN3無添加区に対して有意な ($p < 0.05$) 差であることを示す。

図2は細胞内cAMP量によるFPR L1-GFP受容体発現させたCHO細胞に特異的なhuman in類似ベクター(HN3) のリガンド活性の用量依存性を調べた結果を示す。ホルスコリンで刺激しない状態(Bas aal) に対し、ホルスコリンを1 μ M添加(FSK)、および図中に表示の濃度(μ M)のHN3をホルスコリン存在下でインキュベーションし、細胞内cAMP量を比較した結果である。Bas aalはホルスコリン(FSK) およびリガンドを添加していない場合を示す。FSKはホルスコリンを添加した場合を示す。Li g and (μ M) + FSKはHN3とホルスコリンを添加した場合を示す。Li g andの数字は添加したHN3の濃度(μ M) を示す。縦軸のcAMP (pmol/well) は細胞内cAMP量 (pmol/well) を示す。

図3は細胞内cAMP量によるFPR L1-GFP受容体を発現させていないCHO細胞(mock) に特異的なhuman in類似ベクター(HN3) のリガンド活性の用量依存性を調べた結果を示す。ホルスコリンで刺激しない状態(Bas aal) に対し、ホルスコリンを1 μ M添加(FSK)、および図中に表示の濃度(μ M) のhuman in類似ベクター(HN3) をホルスコリン存在下でインキュベーションし、細胞内cAMP量を比較した結果である。Bas aalはホルスコリン(FSK) およびリガンドを添加していない場合を示す。FSKはホルスコリンを添加した場合を示す。Li g and (μ M) + FSKはHN3とホルスコリンを添加した場合を示す。縦軸の数字は添加したHN3の濃度(μ M) を示す。縦軸のcAMP (pmol/well) は細胞内cAMP量 (pmol/well) を示す。

図4は各レセプター蛋白質を発現するCHO細胞に各種リガンドを反応させた時の細胞内cAMP量を測定し、EC₅₀値(nM) を求めた結果を示す。EC₅₀ valuesはEC₅₀値を示す。Sampleは使用したリガンド試料を示す。HN3は配列番号: 6で表わされるアミノ酸配列からなるhuman in類似ベクター(HN3) を示す。W-peptideはTrrp-Lys-Tyr-Met-Val-dMet-NH₂ (配列番号: 31) を示す。

25

す。dMe tはD体のMe tを示す。β-Amyloid (1-42) はβ-アミロイド(1-42)を示す。hFPR1はヒト由来FPRLを示す。hFPRL1はヒト由来FPRL1を示す。hFPRL2はヒト由来FPRL2を示す。mFPRL2はマウス由来FPRL2 (FPRL1)を示す。rFPRL1はラット由来FPRL1を示す。>100000は10000nM以上を示す。

発明を実施するための最良の形態

本発明で使用されるFPRL1は、配列番号：1、配列番号：17または配列番号：19で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質である。

本発明で使用されるFPRL2は、配列番号：21で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質である。

FPRL1またはFPRL2は、例えば、ヒトや哺乳動物(例えば、モルモット、ラット、マウス、ウサギ、ゾウ、ヒツジ、ウシ、サルなど)のあらゆる細胞(例えば、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、腔臓β細胞、骨髄細胞、マサチューセッツ州、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞(例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球)、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など)や血球系の細胞、またはこれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位(例、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、視床下核、大脳皮質、延髄、小脳、後頭葉、前頭葉、側頭葉、被殻、尾状核、脳梁、黒質)、腎臓、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管(例、大腸、小腸)、腸管、血管、心臓、胸腺、脾臓、頸下腺、末梢血、末梢血球、前立腺、睾丸、精巣、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋など、特に、脾臓、骨髄、腸管、単球、マ

クロマチンなどの免疫担当臓器と免疫担当細胞に由来する蛋白質であつてもよく、また合成蛋白質であつてもよい。

配列番号：1、配列番号：17または配列番号：19で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、例えば、配列番号：1、配列番号：17または配列番号：19で表わされるアミノ酸配列と約85%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

本発明の配列番号：1、配列番号：17または配列番号：19で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質としては、例えば、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、配列番号：1、配列番号：17または配列番号：19で表わされるアミノ酸配列からなるFPRL1と実質的に同質の活性を有する蛋白質などが好ましい。

配列番号：17で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、例えば、配列番号：17で表わされるアミノ酸配列と約85%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

本発明の配列番号：17で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質としては、例えば、配列番号：17で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、配列番号：17で表わされるアミノ酸配列からなるFPRL2と実質的に同質の活性を有する蛋白質などが好ましい。

アミノ酸配列の相同性は、相同性計算アルゴリズムNCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool)を用い、以下の条件(期待値=10;ギャップを許す;マトリクス=BLOSUM62;フィアルティング=OFF)にて計算することができる。

実質的に同質の活性としては、例えば、リガンド結合活性、シグナル情報伝

遮作用などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの活性が性質的に同質であることを示す。したがって、リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性が同等（例、約0.01～100倍、好ましくは約0.5～20倍、より好ましくは約0.5～2倍）であることが好ましいが、これらの活性の程度や蛋白質の分子量などの量的要素は異なってもよい。

リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性の測定は、自体公知の方法に準じて行なうことができるが、例えば、後に記載するスクリーニング方法に従って測定することができる。

また、F P R L 1としては、a) 配列番号：1、配列番号：17または配列番号：19で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、b) 配列番号：1、配列番号：17または配列番号：19で表わされるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、c) 配列番号：1、配列番号：17または配列番号：19で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、またはd) それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有する蛋白質なども用いられる。

F P R L 2としては、a) 配列番号：21で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、b) 配列番号：21で表わされるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、c) 配列番号：21で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、またはd) それらを組み合わ

せたアミノ酸配列を含有する蛋白質なども用いられる。

本明細書におけるF P R L 1またはF P R L 2は、ペプチド標記の慣例に従って、左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するF P R L 1をはじめとするF P R L 1は、C末端がカルボキシル基（-COOH）、カルボキシル基（-COO⁻）、アミド（-CONH₂）またはエステル（-COOR）の何れであってもよい。

ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピルもしくはn-ブチルなどのC₁₋₆アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどのC₅₋₆シクロアルキル基、例えば、フェニル、α-ナフチルなどのC₆₋₁₂アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル-C₁₋₂アルキル基もしくはα-ナフチルメチルなどのα-ナフチル-C₁₋₂アルキル基などのC₇₋₁₄アルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるジバロイルオキシメチル基などが用いられる。

F P R L 1またはF P R L 2がC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミドまたはエステル化されているものも本発明のF P R L 1またはF P R L 2に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

さらに、F P R L 1またはF P R L 2には、上記した蛋白質において、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチルなどのC₂₋₆アルカノイル基などのC₁₋₆アシル基など）で保護されているもの、N末端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば、-OH、-SH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチルなどのC₂₋₆アルカノイル基などのC₁₋₆アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖蛋白質などの複合蛋白質なども含まれる。

本発明のF P R L 1の具体例としては、例えば、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列からなるヒト由来F P R L 1、配列番号：17で表わされるアミ

ノ酸配列からなるラット由来F P R L 1、配列番号：19で表わされるアミノ酸配列からなるマウス由来F P R L 2などが用いられる。このヒト由来F P R L 1は、J. Biol. Chem. 267(11), 7637-7643(1992)に記載されている公知の蛋白質である。マウス由来F P R L 2は、J. Immunol. 169, 3363-3369 (2002)に記載されている公知の蛋白質である。

本発明のF P R L 2の具体例としては、例えば、配列番号：21で表わされるアミノ酸配列からなるヒト由来F P R L 2などが用いられる。このヒト由来F P R L 2は、Genomics 13 (2), 437-440 (1992)に記載されている公知の蛋白質である。

F P R L 1またはF P R L 2の部分ペプチド(以下、本発明の部分ペプチドと略記する場合がある)としては、上記したF P R L 1またはF P R L 2の部分ペプチドであれば何れのものであってもよいが、例えば、F P R L 1またはF P R L 2の蛋白質分子のうち、細胞膜の外に露出している部位であって、実質的に同質のレセプター結合活性を有するものなどが用いられる。

具体的には、配列番号：1、配列番号：17または配列番号：19で表わされるアミノ酸配列を有するF P R L 1の部分ペプチドまたは配列番号：21で表わされるアミノ酸配列を有するF P R L 2の部分ペプチドとしては、疎水性プロット解析において細胞外領域(親水性(Hydrophilic)部位)であると分析された部分を含むペプチドである。また、疎水性(Hydrophobic)部位を一部に含むペプチドも同様に用いることができる。個々のドメインを個別に含むペプチドも用い得るが、複数のドメインを同時に含む部分のペプチドでも良い。

本発明の部分ペプチドのアミノ酸の数は、上記した本発明のレセプター蛋白質の構成アミノ酸配列のうち少なくとも20個以上、好ましくは50個以上、より好ましくは100個以上のアミノ酸配列を有するペプチドなどが好ましい。実質的に同一のアミノ酸配列とは、これらアミノ酸配列と約85%以上、好ましくは約90%以上、より好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列を示す。

アミノ酸配列の相同性は、相同性計算アルゴリズムANCB1 BLAST (National Center for Biotechnology I

information Basic Local Alignment Search Tool)を用い、以下の条件(期待値=10;ギャップを許す;マトリクス=BLOSUM62;ライクリシグ=OFF)にて計算することができる。

ここで、「実質的に同質のレセプター活性」とは、上記と同意義を示す。「実質的に同質のレセプター活性」の測定は上記と同様に行なうことができる。また、本発明の部分ペプチドは、上記アミノ酸配列中の1または2個以上(好ましくは、1~10個程度、さらに好ましくは数個(1~5個))のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上(好ましくは、1~20個程度、より好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは数個(1~5個))のアミノ酸が付け加し、または、そのアミノ酸配列中の1または2個以上(好ましくは、1~10個程度、より好ましくは数個、さらに好ましくは1~5個程度)のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。

また、本発明の部分ペプチドはC末端がカルボキシ基(-COOH)、カルボキシレート(-COO⁻)、アミド(-CONH₂)またはエステル(-COOR)の何れであってもよい。本発明の部分ペプチドがC末端以外にカルボキシ基(またはカルボキシレート)を有している場合、カルボキシ基がアミド化またはエステル化されているものも本発明の部分ペプチドに含まれる。

この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

さらに、本発明の部分ペプチドには、上記したF P R L 1またはF P R L 2と同様に、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基で保護されているもの、N末端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

本発明のF P R L 1、F P R L 2またはその部分ペプチドの塩としては、酸または塩基との生理学的に許容される塩が挙げられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸(例えば、

塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸)との塩、あるいは有機酸(例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、マール酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸)との塩などが用いられる。

本発明のF P R L 1またはその塩は、上記したヒトや哺乳動物の細胞または組織から自他公知のレセプター蛋白質の精製方法によって製造することもできるし、後に記載する本発明のF P R L 1をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後に記載する蛋白質合成法またはこれに準じて製造することもできる。

ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせてすることにより精製分離することができる。

本発明のF P R L 1もしくはその部分ペプチドまたはその塩またはそのアミド体の合成には、通常市販の蛋白質合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ペンズヒドリアルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルペンズヒドリアルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などを挙げることができる。このような樹脂を用い、 α -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とする蛋白質の配列通りに、自他公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂から蛋白質を切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的の蛋白質またはそのアミド体を取得する。

上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、蛋白質合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DCC、N, N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エ

チル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤(例えば、HOBt、HOObt)とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するか、または、対称酸無水物またはHOBTエステルあるいはHOObtエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、蛋白質縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N, N'-ジメチルホルムアミド、N, N'-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジン、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度は蛋白質縮合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約-20〜50℃の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5〜4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行うことな

り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することができる。

原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、ターシヤーベンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、C1-2、Bt-2、アザベンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホルムイルオキシカルボニルなどが用いられる。

カルボキシ基は、例えば、アルキルエステル化(例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ターシヤーブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクタチル、2-アザベンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化)、アラルキルエステル化(例えば、ベンジル

5 エステル、4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル(c)、フェニシルエステル、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、タージヤリーグトキシカルボ
10 ニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの
15 低級アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒド
20 ロピニル基、ヒンナチル基などである。

10 テロジンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bz1、Cl1、Bz1、2-ニトロベンジル、Benz、タージヤリーグチルなどが用いられる。

15 ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Tos、4-メトキシ-2、3、6-トリメチルベンゼンスルホン、DNP、ベンジルオキシメチル、Bum、Boc、Ttt、Fmocなどが用いられる。

20 原料のカルボキシ基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル(アルコール(例えば、ベンタクロロフェノール、2、4、5-トリクロロフェノール、2、4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシスチミド、N-ヒドロキシタルイミド、HOBt)とのエステル)などが用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。

25 保護基の除去(脱離)方法としては、例えば、Pd-黒あるいはPd-炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水酢化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アゾモニウム中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、

一般に約-20~40℃の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレソール、パラクレソール、ジメチルスルフィド、1、4-ブタンジチオール、1、2-エタンジチオールなどのようなカチオン捕獲剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミ
5 ソール保護基として用いられる2、4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1、2-エタンジチオール、1、4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アゾモニ
10 ユムなどによるアルカリ処理によっても除去される。

10 原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。

15 蛋白質のアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端アミノ酸のα-カルボキシ基をアミド化して保護した後、アミノ基側にベンザチド(蛋白質)鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ベンザチド鎖のN末端のα-アミノ基の保護基のみを除いた蛋白質とC末端のカルボキシ基の保護基のみを除去した蛋白質とを製造し、この両蛋白質を上記したような混合溶液中で結
20 合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護蛋白質を精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗蛋白質を得ることができる。この粗蛋白質は既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することによって所望の蛋白質のアミド体を得ることができる。

25 蛋白質のエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸のα-カルボキシ基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、蛋白質のアミド体と同様にして、所望の蛋白質のエステル体を得ることができる。

本発明のFRL1の部分ペプチドまたはその塩は、自己公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明のFRL1を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明のFRL

L1を構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを結合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下のa)～e)に記載された方法が挙げられる。

- 5 a) M. Bodanszky および M. A. Ondetti、ペプチド シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)
- b) Schroeder および Fluebeck、ザ ペプチド (The Peptide), Academic Press, New York (1965年)

- c) 泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)
- 10 d) 矢島治明 および 神原俊平、生化学実験講座 1、蛋白質の化学IV、205、(1977年)

- e) 矢島治明監修、医薬製品の開発 第14巻 ペプチド合成 広川書店
- また、反応後は通常の精製法、例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明の部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られる部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。本発明のFPR L2、その部分ペプチドまたはその塩も上記と同様の方法で製造することができる。

- 20 本発明のFPR L1またはFPR L2をコードするポリヌクレオチドとしては、上記した本発明のFPR L1またはFPR L2をコードする塩基配列(DNAまたはRNA、好ましくはDNA)を含有するものであればいかなるものであってもよい。該ポリヌクレオチドとしては、本発明のFPR L1またはFPR L2をコードするDNA、mRNA等のRNAであり、二本鎖であつても、一本鎖であつてもよい。二本鎖の場合は、二本鎖DNA、二本鎖RNAまたはDNA:RNAのハイブリッドでもよい。一本鎖の場合は、センス鎖(すなわち、コード鎖)であつても、アンチセンス鎖(すなわち、非コード鎖)であつてもよい。

本発明のFPR L1またはFPR L2をコードするポリヌクレオチドを用い

て、例えば、公知の実験医学増刊「新PCRとその応用」15(7)、1997記載の方法またはそれに準じた方法により、本発明のFPR L1またはFPR L2のmRNAを定量することができる。

- 5 本発明のFPR L1またはFPR L2をコードするDNAとしては、ゲノムDNA、クノムDNAライブラリー、上記した細胞・組織由来のcDNA、上記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであつてもよい。また、上記した細胞・組織よりtotal RNAまたはmRNA画分を調製したものをを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RTPCR法と略称する)によって増幅することもできる。

- 10 具体的には、本発明のFPR L1をコードするDNAとしては、例えば、配列番号: 2、配列番号: 18または配列番号: 20で表わされる塩基配列を含有するDNA、または配列番号: 2で表わされる塩基配列とハイストリレンジン条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号: 1、配列番号: 17または配列番号: 19で表わされるアミノ酸配列からなるFPR L1と実質的に同質の活性(例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など)を有するレセプター蛋白質をコードするDNAであれば何れのものでもよい。

- 20 配列番号: 2、配列番号: 18または配列番号: 20で表わされる塩基配列とハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号: 2、配列番号: 18または配列番号: 20で表わされる塩基配列と約85%以上、好ましくは約90%以上、より好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

- 25 本発明のFPR L2をコードするDNAとしては、例えば、配列番号: 22で表わされる塩基配列を含有するDNA、または配列番号: 22で表わされる塩基配列とハイストリレンジン条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号: 21で表わされるアミノ酸配列からなるFPR L2と実質的に同質の活性(例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など)を有するレセプター蛋白質をコードするDNAであれば何れのものでもよい。

配列番号：22で表わされる塩基配列とハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：22で表わされる塩基配列と約85%以上、好ましくは約90%以上、より好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

- 5 塩基配列の相同性は、相同性計算アルゴリズムNCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) を用い、以下の条件 (期待値=10; ギャップを許す; ハイブリディング=ON; マッチスコア=1; ミスマッチスコア=-3) にて計算することができる。

- 10 ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行うことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行うことができる。より好ましくは、ハイストリシジェントな条件に従って行うことができる。

- 15 該ハイストリシジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19~40 mM、好ましくは約19~20 mMで、温度が約50~70℃、好ましくは約60~65℃の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約19 mMで温度が約65℃の場合が最も好ましい。

- 20 より具体的には、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列からなるヒトFRL1をコードするDNAとしては、配列番号：2で表わされる塩基配列からなるDNAなどが用いられる。配列番号：17で表わされるアミノ酸配列からなるラットFRL1をコードするDNAとしては、配列番号：18で表わされる塩基配列からなるDNAなどが用いられる。配列番号：19で表わされるアミノ酸配列からなるマウスFRL2をコードするDNAとしては、配列番号：20で表わされる塩基配列からなるDNAなどが用いられる。配列番号：21で表わされるアミノ酸配列からなるヒトFRL2をコードするDNAとしては、配列番号：22で表わされる塩基配列からなるDNAなどが用いられ

る。

本発明のFRL1またはFRL2をコードするDNAの塩基配列の一部、または該DNAと相補的な塩基配列の一部を含有してなるポリヌクレオチドとは、下記の本発明の部分ベクタをコードするDNAを包含するだけではなく、RNAをも包含する意味で用いられる。

- 5 本発明に従えば、FRL1遺伝子またはFRL2遺伝子の複製または発現を阻害することのできるアンチセンス・ポリヌクレオチド (核酸) を、クロン化した、あるいは決定されたFRL1またはFRL2をコードするDNAの塩基配列情報に基づき設計し、合成しうる。そうしたポリヌクレオチド (核酸) は、FRL1遺伝子またはFRL2遺伝子のRNAとハイブリダイズすることができ、該RNAの合成または機能を阻害することができるか、あるいはFRL1関連RNAまたはFRL2関連RNAとの相互作用を介してFRL1遺伝子またはFRL2遺伝子の発現を調節・制御することができる。FRL1関連RNAまたはFRL2関連RNAの選択された配列に相補的なポリヌクレオチド、およびFRL1関連RNAまたはFRL2関連RNAと特異的にハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドは、生体内および生体外でFRL1遺伝子またはFRL2遺伝子の発現を調節・制御するのに有用であり、また病気などの治療または診断に有用である。用語「対応する」とは、遺伝子を含めたヌクレオチド、塩基配列または該酸の特定の配列に相同性を有するあるいは相補的であることを意味する。ヌクレオチド、塩基配列または該酸とベクタ (蛋白質) との間で「対応する」とは、ヌクレオチド (核酸) の配列またはその相補体から誘導される指令にあるベクタ (蛋白質) のアミノ酸を通常指している。FRL1遺伝子またはFRL2遺伝子の5' 端ヘアピンループ、5' 端6-ベースヘア・リベート、5' 端非翻訳領域、ポリベクタ翻訳開始コドン、蛋白質コード領域、ORF翻訳開始コドン、3' 端非翻訳領域、3' 端ポリシドローム領域、および3' 端ヘアピンループは好ましい対象領域として選択しうるが、FRL1遺伝子またはFRL2遺伝子内の如何なる領域も対象として選択しうる。

目的核酸と、対象領域の少なくとも一部に相補的でハイブリダイズすること

ができるポリヌクレオチドとの関係は、対象物と「アンチセンス」であるということができる。アンチセンス・ポリヌクレオチドは、2-デオキシ-D-リボースを含有しているポリデオキシリボヌクレオチド、D-リボースを含有しているポリリボヌクレオチド、プリンまたはピリミジン塩基のN-グリコシドであるその他のタイプのポリヌクレオチド、あるいは非ヌクレオチド骨格を有するその他のポリマー（例えば、市販の蛋白質核酸および合成配列特異的な核酸ポリマー）または特殊な結合を含有するその他のポリマー（但し、該ポリマーはDNAやRNA中に見出されるような塩基のペアリングや塩基の付着を許容する配座をもつヌクレオチドを含有する）などが挙げられる。それらは、2本鎖DNA、1本鎖DNA、2本鎖RNA、1本鎖RNA、さらにDNA：RNAハイブリッドであることができ、さらに非修飾ポリヌクレオチド（または非修飾オリゴヌクレオチド）、さらには公知の修飾の付加されたもの、例えば当該分野で知られた標識のあるもの、キヤップの付いたもの、メチル化されたもの、1個以上の天然のヌクレオチドを類縁物で置換したもの、分子内ヌクレオチド修飾のされたもの、例えば非荷電結合（例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、カルバメートなど）を持つもの、電荷を有する結合または硫黄含有結合（例えば、ホスホロチオエート、ホスホロチオエートなど）を持つもの、例えば蛋白質（ヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ・インヒビター、トキシン、抗体、シグナルペプチド、ポリーリーリジンなど）や糖（例えば、モノサッカライドなど）などの側鎖基を有しているもの、イソカーカレント化合物（例えば、アクリジン、ソラレンなど）を持つもの、キレート化合物（例えば、金属、放射活性をもつ金属、ホウ素、酸化性の金属など）を含有するもの、アルキル化剤を含有するもの、修飾された結合を持つもの（例えば、αアノマー型の核酸など）であってよい。ここで「ヌクレオシド」、「ヌクレオチド」および「核酸」とは、プリンおよびピリミジン塩基を含有するのみでなく、修飾されたその他の複素環型塩基をもつようなものを含んでいてよい。こうした修飾物は、メチル化されたプリンおよびピリミジン、アシル化されたプリンおよびピリミジン、あるいはその他の複素環を含むものであってよい。修飾されたヌクレオチドおよび修飾されたヌクレオチドはまた

糖部分が修飾されていてよく、例えば、1個以上の水酸基がハロゲンとか、脂肪族基などで置換されていたり、あるいはエーテル、アミンなどの官能基に交換されていてよい。

本発明のアンチセンス・ポリヌクレオチド（核酸）は、RNA、DNA、あるいは修飾された核酸（RNA、DNA）である。修飾された核酸の具体例としては核酸の硫黄誘導体やチオホスファート誘導体、そしてポリヌクレオシドアミドやオリゴヌクレオシドアミドの分解に抵抗性のもが挙げられるが、それに限定されるものではない。本発明のアンチセンス核酸は次のような方針で好ましく設計されうる。すなわち、細胞内でのアンチセンス核酸をより安定なものにする、アンチセンス核酸の細胞透過性をより高める、目標とするセンス鎖に対する親和性をより大きなものにする、そしてもし毒性があるならアンチセンス核酸の毒性をより小さなものにする。

こうして修飾は当該分野で数多く知られており、例えば J. Kawakami et al., Pharm Tech Japan, Vol. 8, pp. 247, 1992; Vol. 8, pp. 395, 1992; S. T. Crooke et al. ed., Antisense Research and Applications, CRC Press, 1993 などに開示がある。

本発明のアンチセンス核酸は、変化せしめられたり、修飾された糖、塩基、結合を含有して良く、リボゾーム、ミクロソームのような特殊な形態で供与されたり、遺伝子治療により適用されたり、付加された形態で与えられることができる。こうして付加形態で用いられるものとしては、リン酸基骨格の電荷を中和するように働くポリリジンのようなポリカチオン体、細胞膜との相互作用を高めたり、核酸の取込みを増大せしめるような脂質（例えば、ホスホリピド、コレステロールなど）といった親水性のものが挙げられる。付加するに好ましい脂質としては、コレステロールやその誘導体（例えば、コレステリルクロホルメート、コール酸など）が挙げられる。こうしたものは、核酸の3' 端あるいは5' 端に付着させることができる。塩基、糖、分子内ヌクレオシド結合を介して付着させることができる。その他の基としては、核酸の3' 端あるいは5' 端に特異的に配置されたキヤップ用の基で、エキソヌクレアーゼ、RNAse などのヌクレアーゼによる分解を阻止するためのものが挙げ

られる。こうしたキヤップ用の基としては、ポリエチレングリコール、テトラエチレングリコールなどのグリコールをはじめとした当該分野で知られた水酸基の保護基が挙げられるが、それに限定されるものではない。

アッセイの阻害活性は、本発明の形質転換体、本発明の生体内や生体外の遺伝子発現系、あるいはG蛋白質共役型シグナル蛋白質の生体内や生体外の調節系を用いて調べることができる。該核酸それ自体公知の各種の方法で細胞に適用できる。

本発明のF P R L 1の部分ベクタをコードするDNAとしては、上記した本発明のF P R L 1の部分ベクタをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、上記した細胞・組織由来のcDNA、上記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってよい。また、上記した細胞・組織よりmRNA画分を調製したものをを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、R T - P C R法と略称する) によって増幅することもできる。

具体的には、本発明のF P R L 1の部分ベクタをコードするDNAとしては、例えば、(1) 配列番号：2、配列番号：18または配列番号：20で表わされる塩基配列を有するDNAの部分塩基配列を有するDNA、または(2) 配列番号：2、配列番号：18または配列番号：20で表わされる塩基配列とハイストリジンゼンタ条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：1、配列番号：17または配列番号：19で表わされるアミノ酸配列からなるF P R L 1と実質的に同質の活性(例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など)を有するシグナル蛋白質をコードするDNAの部分塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

配列番号：2、配列番号：18または配列番号：20で表わされる塩基配列ハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：2、配列番号：18または配列番号：20で表わされる塩基配列と約85%以上、好ましくは約90%以上、より好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有す

るDNAなどが用いられる。

本発明のF P R L 2の部分ベクタをコードするDNAとしては、例えば、(1) 配列番号：22で表わされる塩基配列を有するDNAの部分塩基配列を有するDNA、または(2) 配列番号：22で表わされる塩基配列とハイストリジンゼンタ条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：21で表わされるアミノ酸配列からなるF P R L 2と実質的に同質の活性(例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など)を有するシグナル蛋白質をコードするDNAの部分塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

配列番号：22で表わされる塩基配列ハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：22で表わされる塩基配列と約85%以上、好ましくは約90%以上、より好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

塩基配列の相同性は、相同性計算アルゴリズムNCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) を用い、以下の条件(期待値=10; キヤップを許す; ファイルリンゲ=ON; マッチスコア=1; ミスマッチスコア=-3) にて計算することができる。

ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行うことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行うことができる。より好ましくは、ハイストリジンゼンタ条件下に従って行うことができる。

該ハイストリジンゼンタ条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19~40 mM、好ましくは約19~20 mMで、温度が約50~70℃、好ましくは約60~65℃の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約19 mMで温度が約65℃の場合が最も好ましい。

本発明のF P R L 1またはその部分ベクタ(以下、F P R L 1と略記する

場合がある) または本発明の F P R L 2 またはその部分ベクター (以下、F P R L 2 と略記する場合がある) を完全にコードする DNA のクローニングの手段として、本発明の F P R L 1 または F P R L 2 の部分塩基配列を有する合成 DNA アライマーを用いて PCR 法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだ DNA を本発明の F P R L 1 または F P R L 2 の一部あるいは全領域をコードする DNA 断片もしくは合成 DNA を用いて標識したものとハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。

DNA の塩基配列の変換は、PCR や公知のキット、例えば、Mutan™-K (宝酒造 (株)) などを用いて、ODAL-PCR 法、Gapped duplex 法、Kunkel 法などの公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。

クローン化された F P R L 1 または F P R L 2 をコードする DNA は目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該 DNA はその 5' 末端側に翻訳開始コドンとしての ATG を有し、また 3' 末端側には翻訳終止コドンとしての TAA、TGA または TAG を有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成 DNA アダプターを用いて付加することもできる。

本発明の F P R L 1 または F P R L 2 の発現ベクターは、例えば、(イ) 本発明の F P R L 1 または F P R L 2 をコードする DNA から目的とする DNA 断片を切り出し、(ロ) 該 DNA 断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド (例、pBR322、pBR325、pUC12、pUC13)、枯草菌由来のプラスミド (例、pUB110、pTP5、pC194)、酵母由来プラスミド (例、pSH19、pSH

i5)、λファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ククジニウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11、pXT1、pRec/CMV、pRec/RSV、pCDNA1/Neo などが用いられる。

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SRαプロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどが挙げられる。

これらのうち、CMVプロモーター、SRαプロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、lrrpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、λP_Lプロモーター、lppプロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SP01プロモーター、SP02プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、ヌクレオチドシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン (以下、SV40ori と略称する場合がある) などを含んでいるものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素 (以下、dhfr と略称する場合がある) 遺伝子 (メソレキセート (MTX) 耐性)、アンピシリン耐性遺伝子 (以下、Amp^r と略称する場合がある)、ネオマイシン耐性遺伝子 (以下、Neo^r と略称する場合がある、G418 耐性) 等が挙げられる。特に、CHO (dhfr⁻) 細胞を用いて dhfr 遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチャミジンを含まない培地によっても選択できる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のレセプター蛋白質の N 末端側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoA

・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 α -アミラーゼ・シグナル配列、サチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、MF α ・シグナル配列、SUC2・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インジュリン・シグナル配列、 α -インテグリン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できるとする。

このようにして構築された本発明のF_{PRL1}またはF_{PRL2}をコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

宿主としては、例えば、エシエリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。

エシエリヒア属菌の具体例としては、エシエリヒア・コリ (*Escherichia coli* K12・DH1 [プロシエジנגス・オプ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス]ズ・オプ・ザ・ユーエスエー [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.], 60巻, 160(1968)), JM103 [ヌク萊イック・アシッド・リサーチ (Nucleic Acids Research), 9巻, 309(1981)], JA221 [ジヤーマナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology), 120巻, 517(1978)], HB101 [ジヤーマナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459(1969)], C600 [ジエネティックス (Genetics), 39巻, 440(1954)] などが用いられる。

20
 バチルス属菌としては、例えば、バチルス・ヌブチルス (*Bacillus subtilis*
) MI 114 (ジーン, 24巻, 255 (1983)), 207-21 [ジャー
 ナル・オブ・バイオケミストリー (*Journal of Biochemistry*), 95巻, 87
 (1984)] などが用いられる。

酵母としては、例えば、サツカロマイセス セレビジエ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH22, AH22R⁻, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12, シソサツカロマイセス ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) NCYC1913, NCYC2036、ビキヤ バストリス (*Pichia pastoris*) などを用いられる。

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがA_cNPVの場合は、夜盗蛾の幼虫

由来株化細胞 (Spodoptera frugiperda cell; S f 細胞)、Trichoplusia ni の中腸由来の MG1 細胞、Trichoplusia ni の卵由来の High Five™ 細胞、Mamestra brassicae 由来の細胞または Estigmena acrea 由来の細胞などが用いられる。ウ イルスが BmNPV の場合は、蚕由来株化細胞 (Bombyx mori N、BmN 細胞) などが用いられる。該 S f 細胞としては、例えば、S f 9 細胞 (ATCC CRL1711)、S f 2.1 細胞 (以上: Vaughn, J.L. ら、イン・ヴィボ (In Vivo)、13, 213-217, (1977)) などが用いられる。

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる（前田ら、ネイチャー（Nature），315巻，592（1985））。

10. 動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7, Ver o, チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO細胞と略記)、dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO (dhfr⁻) 細胞と略記)、マウス細胞、マウスA₁T-20、マウスミエローマ細胞、ラットGH3、ヒトF1細胞などが用いられる。

15 エシエリヒア風菌を形質転換するには、例えば、プロシージンダス・オファ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシーズ・オブ・ザ・ユエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 69巻, 2110 (1972) やジェンセン (Gene), 17巻, 107 (1982) などに記載の方法に従って行なうことができる。

20 バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキエラー・アソド・ジェネラル・ジェネティクス (Molecular & General Genetics), 168巻, 111(1979)などに記載の方法に従って行なうことができる。

酵母を形質転換するには、例えば、メツンズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology), 194巻, 182-187 (1991)、フロシー・ジンガズ・オフ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユースエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 75巻, 1929 (1978) などに記載の方法に従って行なうことができる。

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、ハイオ/テクノロジー（Bio/Technology），6，47-55（1988）などに記載の方法に従って行

なうことができる。

動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊8新細胞工学実験プロトコル、263-267(1995)(秀潤社発行)、ウイルスロジー(Virology), 52巻, 456(1973)に記載の方法に従って行なうことができる。

- 6 このようにして、F P R L 1またはF P R L 2をコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体が得られる。

- 10 宿主がエシエリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生存に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含ませしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、シロ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチーチー・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、パレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5〜8が望ましい。

- 15 エシエリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地(ミラー(Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティクス(Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972)が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3β-インドリル アクリル酸のような薬剤を加えることができる。

- 20 宿主がエシエリヒア属菌の場合、培養は通常約15〜43℃で約3〜24時間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

- 25 宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30〜40℃で約6〜24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バーホルダー(Burkholder)最小培地(Bostian, K. L.ら、プロシージンダス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシス・オブ・ザ・ユー

- 6 エスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77巻, 4505(1980)]や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地[Bitter, G. A.ら、プロシージンダス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシス・オブ・ザ・ユースエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 81巻, 5330(1984)]が挙げられる。培地のpHは約5〜8に調整するのが好ましい。培養は通常約20〜35℃で約24〜72時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

- 10 宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, I. C. C., ネイチャー(Nature), 195, 788(1962))に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2〜6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3〜5日間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

- 15 宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約5〜20%の胎児牛血清を含むMEM培地(サイエンス(Science), 122巻, 501(1952)), DMEF培地(ウイルスロジー(Virology), 8巻, 396(1959)), RPMI 1640培地(ジャーナル・オブ・アメリカン・メディカル・アソシエーション(The Journal of the American Medical Association) 199巻, 519(1967)), 199培地(プロシージンダス・オブ・ザ・ソサエティ・オブ・バイオロジカル・メディシン(Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73巻, 1(1950))などが用いられる。pHは約6〜8であるのが好ましい。培養は通常約30〜40℃で約15〜60時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

- 20 以上のようにして、形質転換体の細胞内、細胞膜または細胞外に本発明のF P R L 1またはF P R L 2を生成せしめることができる。

- 25 上記培養物から本発明のF P R L 1またはF P R L 2を分離精製するには、例えば、下記の方法により行なうことができる。

本発明のF P R L 1またはF P R L 2を培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リソチームおよび/または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりF P R L 1またはF P R

5 L2の粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸ジ
アジジンなどの蛋白質変性剤や、トリトンX-100TMなどの界面活性剤が含
まれているもよい。培養液中にF P R L 1またはF P R L 2が分泌される場合
には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、
上清を集める。

10 このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれるF P R L 1
またはF P R L 2の精製は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行
なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法
などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSD
S-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する
方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィ
ニティクロマトグラフィーなどの特異的新和性を利用する方法、逆相高速液
体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法な
どの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

15 かくして得られるF P R L 1またはF P R L 2が遊離体で得られた場合には、
自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、
逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、
遊離体または他の塩に変換することができる。

20 なお、粗換え体が産生するF P R L 1またはF P R L 2を、精製前または精
製後に適当な蛋白質修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、
ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白質修飾酵素としては、例
えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテ
インキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

25 かくして生成する本発明のF P R L 1またはF P R L 2の活性は、標識した
リガンド (human in 類似ペプチド) との結合実験および特異抗体を用い
たエッセイ・イムノアッセイなどにより測定することができる。

本発明のF P R L 1またはF P R L 2のリガンドはhuman in 類似ペプ
チドまたはその塩である。

human in 類似ペプチドとしては、配列番号：6で表されるアミノ酸配

列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチド (以下、
human in 類似ペプチドと略記する) などが用いられる。

5 human in 類似ペプチドは、ヒトや非ヒト温血動物 (例えば、モルモ
ト、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ゾウ、ヒツジ、ウシ、サル等) の細
胞 (例えば、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、脾臓B細胞、骨髄細胞、
メサネキウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、纖
維芽細胞、纖維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞 (例、マクロファージ、T
細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、
単球)、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細
胞、もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細
10 胞等) もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部
位 (例、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、
小脳)、腎臓、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨
髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管 (例、大腸、小腸)、血管、心臓、胸腺、
脾臓、唾液腺、末梢血、前立腺、嚙丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、軟骨、関節、
15 骨格筋等に由来するポリペプチドであってもよく、粗換えポリペプチドであ
ってもよく、合成ポリペプチドであってもよい。

「実質的に同一」とはhuman in 類似ペプチドの活性、例えば、細胞死
抑制作用 (例、各種疾患に伴う細胞死に対する抑制作用)、細胞生存維持作用、
または神経変性疾患、癌、免疫疾患、感染症、消化管疾患、循環器疾患、内分
20 泌疾患等の予防・治療活性 (作用) など、生理的な特性などが、実質的に同じ
ことを意味する。アミノ酸の置換、欠失、付加あるいは挿入が、ポリペプチド
の生理的な特性や化学的な特性に大きな変化をもたらさない限り、当該置換、
欠失、付加あるいは挿入を施されたポリペプチドは、当該置換、欠失、付加あ
るいは挿入のされていないものと実質的に同一である。該アミノ酸配列中のア
25 ミノ酸の実質的に同一な置換物としては、たとえばそのアミノ酸が属するとこ
ろのクラスのうちの他のアミノ酸類から選ぶことができる。

非極性 (疎水性) アミノ酸としては、アラニン、ロイシン、イソロイシン、
バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、メチオニンなどがあ

げられる。極性（中性）アミノ酸としてはグリシン、セリン、スレオニン、スチレン、チロシン、アスパラギン、グルタミンなどがあげられる。陽電荷をもつ（塩基性）アミノ酸としてはアルギニン、リジン、ヒスチジンなどがあげられる。負電荷をもつ（酸性）アミノ酸としては、アスパラギン酸、グルタミン酸などが挙げられる。

5 配列番号：6で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、該アミノ酸配列を含有するポリペプチドが、配列番号：6で表されるアミノ酸配列からなるhumanin類似ペプチドと実質的に同一の活性（性質）を有する限り、特に限定されるものではなく、例えば配列番号：6で表されるアミノ酸配列と約80%以上、好ましくは約85%以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列等が挙げられる。

アミノ酸配列の相同性は、相同性計算アルゴリズムANCB1 BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) を用い、以下の条件（期待値=10；ギャップを許す；マトリクス=BLOSUM62；アムタリソング=OFF）にて計算することができる。

20 上記の実質的に同質の活性（性質）としては、例えば、配列番号：6で表されるアミノ酸配列を含有するhumanin類似ペプチドの有する細胞死抑制作用（例、各種疾患に伴う細胞死に対する抑制作用）、細胞生存維持作用、または神経変性疾患、癌、免疫疾患、感染症、消化管疾患、循環器疾患、内分泌疾患等の予防・治療活性（作用）などが定性的に同質であることを示す。

また、配列番号：6で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するhumanin類似ペプチドとしてより具体的には、例えば、a) 配列番号：6で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（例えば1～10個程度、好ましくは1～6個程度、より好ましくは1～3個程度、さらに好ましくは1または2個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、b) 配列番号：6で表されるアミノ酸配列に1または2個以上（例えば1～10個程度、好ましくは1～6個程度、より好ましくは1～3個程度、さらに好ましくは1または2個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、c) 配列番号：6で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（例えば1～5個程度、より好ましくは1～3個程度、さらに好ましくは1または2個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、またはd) それらの欠失・付加・置換を組み合わせたアミノ酸配列からなるポリペプチドなども含まれるが、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15または配列番号：16で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドは含まれない。

10 上記のようにアミノ酸配列が挿入、欠失または置換されている場合、その挿入、欠失または置換の位置としては、特に限定されない。

具体的には、humanin類似ペプチドとしては、配列番号：6で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドなどが用いられる。

humanin類似ペプチドは、上記したポリペプチドの部分ペプチドであってもよい。humanin類似ペプチドの部分ペプチドとしては、前記したhumanin類似ペプチドの部分ペプチドであれば何れのものであってもよいが、例えば、humanin類似ペプチドと実質的に同質の活性（「実質的に同質の活性」は上記と同意義を示す）ものなどが好ましく用いられる。

humanin類似ペプチドの部分ペプチドとしてより具体的には、前記した配列番号：6で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドの部分ペプチドなどが挙げられ、好ましくは前記した配列番号：6で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列中の連続する6～20個程度、好ましくは6～15個程度、より好ましくは6～10個程度のアミノ酸配列からなる部分ペプチドなどが用いられる。

「実質的に同一」とは、上記のhumanin類似ペプチドの説明における「実質的に同一」と同意義を示す。

また、humanin類似ペプチドの部分ペプチドとしてより具体的には、例えば、a) 配列番号：6で表されるアミノ酸配列中の6～20個程度、好ましくは6～15個程度、より好ましくは6～10個程度のアミノ酸配列からなるペプチド、またはb) 該アミノ酸配列中の1または2個以上（例、1～6個程度、より好ましくは1～3個程度、さらに好ましくは1または2個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、またはc) 該アミノ酸配列中の1または2個以上（例、1～6個程度、より好ましくは1～3個程度、さらに好ましくは1または2個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、またはd) それらの欠失・付加・置換を組み合わせたアミノ酸配列からなるポリペプチドなども含まれるが、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15または配列番号：16で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドは含まれない。

程度、好ましくは1～3個程度、より好ましくは1または2個)のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、c) 該アミノ酸配列に1または2個以上(例、1～6個程度、好ましくは1～3個程度、より好ましくは1または2個)のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、d) 該アミノ酸配列中の1または2個以上(例、1～6個程度、好ましくは1～3個程度、より好ましくは1または2個)のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、またはe) それらの欠失・付加・置換を組み合わせたアミノ酸配列からなる部分ペプチドなども含まれる。

上記のようにアミノ酸配列が挿入、欠失または置換されている場合、その挿入、欠失または置換の位置としては、特に限定されない。ただし、上記の置換に関しては、配列番号：6で表されるアミノ酸配列の第3、12、14、15、16または24番目のアミノ酸の置換は含まれない。

humanin類似ペプチドの部分ペプチドの具体例として、例えば、a) 配列番号：6で表されるアミノ酸配列の第19番目～24番目、第5番目～24番目、第1番目～20番目、第5番目～20番目、第1番目～21番目、または第5番目～21番目のアミノ酸配列、またはb) 該アミノ酸配列中の1または2個以上(例、1～6個程度、好ましくは1～3個程度、より好ましくは1または2個)のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、c) 該アミノ酸配列に1または2個以上(例、1～6個程度、好ましくは1～3個程度、より好ましくは1または2個)のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、d) 該アミノ酸配列中の1または2個以上(例、1～6個程度、好ましくは1～3個程度、より好ましくは1または2個)のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、またはe) それらの欠失・付加・置換を組み合わせたアミノ酸配列からなり、アミノ酸の数が6～20個程度、好ましくは6～15個程度、より好ましくは6～10個程度である部分ペプチドなどが挙げられる。ただし、上記の置換に関しては、配列番号：6で表されるアミノ酸配列の第3、12、14、15、16または24番目のアミノ酸の置換は含まれない。

humanin類似ペプチドの部分ペプチドのより好ましい具体例として、例えば、配列番号：6で表されるアミノ酸配列の第19番目～24番目(配列番号：9)、第5番目～24番目、第1番目～20番目、第5番目～20番目、

第1番目～21番目、または第5番目～21番目のアミノ酸配列からなるペプチドなどが挙げられる。

また、humanin類似ペプチドまたはその部分ペプチドには、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

さらに、humanin類似ペプチドは、それぞれ単量体の他に、2量体、3量体、4量体などとして存在しているもよく、具体的には、humanin類似ペプチド同士で2量体を形成する場合、本発明の部分ペプチド同士で2量体を形成する場合、humanin類似ペプチドと本発明の部分ペプチドとで2量体を形成する場合などが挙げられる。

さらに、humanin類似ペプチドまたはその部分ペプチド(以下、humanin類似ペプチドと略記する)には、おのおののN末端またはC末端などにエビトープ(抗体認識部位)となりうる任意の外來ペプチド配列(例えば、FLAG、Hisタグ、HAタグ、HSVタグなど)を有しているものも含まれる。

humanin類似ペプチドは、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端(アミノ末端)、右端がC末端(カルボキシル末端)である。配列番号：8で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをはじめとするhumanin類似ペプチドは、C末端がカルボキシル基(—COOH)、カルボキシレート(—COO⁻)、アミド(—CONH₂)またはエステル(—COOR)であってもよい。

ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピルもしくはn-ブチル等のC₁₋₆アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシル等のC₃₋₆シクロアルキル基、例えば、フェニル、n-オクチル等のC₆₋₁₂アリール基、例えば、ベンジル、フェネチル等のフェニル—C₁₋₂アルキル基もしくはα-ナフチルメチル等のα-ナフチル—C₁₋₂アルキル基等のC₁₋₁₄アルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるビバロイルオキシメチル基等が用いられる。

humanin類似ペプチドがC末端以外にカルボキシル基(またはカルボ

キシレート)を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本願明細書におけるhumanin類似ペプチドに含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステル等が用いられる。

さらに、humanin類似ペプチドには、N末端のアミノ酸残基(例、メチオニン残基)のアミノ基が保護基(例えば、ホルミル基、アセチル基等のC₁-アルカノイル等のC₁₋₆-アシル基等)で保護されているもの、生体内で切断されて生成するN末端のグルタミル基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基(例えば-OH、-SH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基等)が適当な保護基(例えば、ホルミル基、アセチル基等のC₁₋₆-アルカノイル基等のC₁₋₆-アシル基等)で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ポリペプチド等の複合ポリペプチド等も含まれる。

humanin類似ペプチドまたはその部分ペプチドの塩としては、生理学的に許容される酸(例、無機酸、有機酸)や塩基(例、アルカリ金属塩)等との塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸(例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸)との塩、あるいは有機酸(例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フタル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リント酸、檸檬酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸)との塩等が用いられる。

以下、明細書では、humanin類似ペプチド、その部分ペプチドまたはその塩をhumanin類似ペプチドと略記する。

humanin類似ペプチドは、前述したヒトや非ヒト温血動物の細胞または組織から公知のポリペプチドの精製方法によって製造することもできるし、後述するhumanin類似ペプチドをコードするポリペプチド(DNA等)を含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後述のペプチド合成法に準じて製造することもできる。

ヒトや非ヒト哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや非ヒト哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸等で抽出を行ない、得られ

た抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー等のクロマトグラフィーを組み合わせるにより精製分離することができる。

humanin類似ペプチドまたはそのアミド体の合成には、通常市販のポリペプチド合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルアミン樹脂、アセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル)-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル)-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂等をあげることができる。このような樹脂を用い、 α -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするポリペプチドの配列通りに、自公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からポリペプチドを切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的のhumanin類似ペプチドまたはそれらのアミド体を取得する。

上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、ポリペプチド合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DCC、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド等が用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤(例えば、HOBT、HOBT)とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対応する酸無水物またはHOBtエステルあるいはHOBTエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、ポリペプチド縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N,N-ジメチルホルムアミド、N,N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドン等の酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルム等のハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノール等のアルコール類、ジメチルスルホキ

シド等のスルホキシド類、ビリジン、ジオキサソ、テトラヒドロフラン等のエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリル等のニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチル等のエステル類あるいはこれらの適宜の混合物等が用いられる。反応温度はポリペプチド結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約 $-20 \sim 50^{\circ}\text{C}$ の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常 $1.5 \sim 4$ 倍過剰で用いられる。ニヒヒリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行なうことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することによって、後の反応に影響を与えないようにすることができる。

原料のアミノ基の保護基としては、例えば、 Z 、 Boc 、 t -ベンジルオキシカルボニル、 C1-Z 、 B1-Z 、 α -ダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、 2 -ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、 Fmoc 等が用いられる。

カルボキシ基は、例えば、アルキルエステル化 (例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、 t -ブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクタチル、 2 -アダマンチル等の直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化)、アラルキルエステル化 (例えば、ベンジルエステル、 4 -ニトロベンジルエステル、 4 -メトキシベンジルエステル、 4 -クロロベンジルエステル、 β -ベンズヒドリルエステル化)、フェナシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、 t -ブチルオキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化等によって保護することができる。

セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基等の低級 (C_{1-6}) アルカノイル基、ベンゾイル基等のアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基等の炭酸から誘導される基等が用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒド

ロピラニル基、 t -ブチル基等である。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、 Bz1 、 C1 、 2 - Bz1 、 2 -ニトロベンジル、 B1-Z 、 t -ブチル等が用いられる。

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、 Tos 、 4 -メトキシ- 2 、 3 、 6 -トリメチルベンゼンスルホニル、 DNP 、ベンジルオキシメチル、 Bum 、 Boc 、 Trt 、 Fmoc 等が用いられる。

原料のカルボキシ基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル [アルコール (例えば、ペンタクロロフェノール、 2 、 4 、 5 -トリクロロフェノール、 2 、 4 -ジニトロフェノール、ジアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、 HONB 、 N -ヒドロキシアジド、 N -ヒドロキシフタルイミド、 HOBT) とのエステル] 等が用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。

保護基の除去 (脱離) 方法としては、例えば、 Pd -黒あるいは Pd -炭素等の触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液等による酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジン等による塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元等も用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約 $-20 \sim 40^{\circ}\text{C}$ の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレノール、パラクレノール、ジメチルスルフィド、 $1,4$ -ジオキサンジオール、 1 、 2 -エタノジオール等のようなカチオン捕獲剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる 2 、 4 -ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンインドル保護基として用いられるホルミル基は上記の 1 、 2 -エタノジオール、 1 、 4 -ジオキサンジオール等の存在下での酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニア等によるアルカリ処理によっても除去される。

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保

保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化等は公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。

humanin類似ペプチドのアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド(ポリペプチド)鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の α -アミノ基の保護基のみを除いたポリペプチドとC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去したポリペプチドとを製造し、この両ポリペプチドを上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護ポリペプチドを精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗ポリペプチドを得ることができ。この粗ポリペプチドは既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要成分を凍結乾燥することです望の類似ペプチドのアミド体を得ることができる。

humanin類似ペプチドのエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、humaninのアミド体と同様にして、所望の類似ペプチドのエステル体を得ることができる。

humanin類似ペプチドは、公知のペプチドの合成法に従っても製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、humaninを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の①～⑤に記載された方法などが挙げられる。

25 ①M. Bodanszky および M. A. Ondetti、ペプチド・ジンセシス (Peptide

Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)。

②SchröderおよびLuebbe、ザ・ペプチド(The Peptide), Academic Press, New York (1965年)。

③泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)。

④矢島浩明 および梅原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学IV、205、(1977年)、および

⑤矢島浩明監修、統医薬品の開発、第14巻、ペプチド合成、広川書店。

また、反応後は通常の精製法、例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶等を組み合わせて本発明のポリペプチド、本発明の部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られるポリペプチドが遊離体である場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって適当な塩に変換することができる。逆に塩で得られた場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって遊離体または他の塩に変換することができる。

humanin類似ペプチドをコードするポリヌクレオチド(以下、これらを総称して、本発明のポリヌクレオチドと称する場合がある)としては、前述したhumaninをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい(DNAまたはRNA、好ましくはDNA)。該ポリヌクレオチドとしては、humanin類似ペプチドをコードするDNA、mRNA等のRNAであり、二本鎖であっても、一本鎖であってもよい。二本鎖の場合は、二本鎖DNA、二本鎖RNAまたはDNA:RNAのハイブリッドでもよい。一本鎖の場合は、センス鎖(すなわち、コード鎖)であっても、アンチセンス鎖(すなわち、非コード鎖)であってもよい。

humanin類似ペプチドをコードするDNAとしては、ゲノムDNA、前記した細胞または組織由来のcDNA、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミド等いずれであってもよい。また、前記した細胞または組織よりtotalRNAまたはmRNA画分を調製したものをを用いて直接Reverse

25 Transcription Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR法と略称する) によって増幅することもできる。

humanin類似ペプチドをコードするDNAとして、具体的には、配列番号: 5で表される塩基配列を有するDNAを含有するDNAなどが挙げられる。

配列番号：5で表される塩基配列とハイストリンゼントな条件下でハイブリダイズできるDNAもhumanin類似ペプチドをコードするDNAとして挙げることができ、例えば、配列番号：5で表される塩基配列と約80%以上、好ましくは約85%以上、さらに好ましくは約90%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNA等が用いられる。

塩基配列の相同性は、相同性計算アルゴリズムNCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) を用い、以下の条件 (期待値=10; キヤップを許す; ファルタリソグ=ON; マッチスコア=1; ミスマッチスコア=-3) にて計算することができる。

ハイブリダイゼーションは、公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法等に従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンゼントな条件に従って行なうことができる。

ハイストリンゼントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19~40 mM、好ましくは約19~20 mMで、温度が約50~70℃、好ましくは約60~65℃の条件を示す。

配列番号：6で表されるアミノ酸配列からなるhumanin類似ペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：5で表される塩基配列からなるDNA等が挙げられる。

humanin類似ペプチドの部分ペプチドをコードするDNAとしては、humanin類似ペプチドの部分ペプチドをコードするDNAであれば何れのものでもよい。具体例には、配列番号：9で表されるアミノ酸配列からなる部分ペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：10で表される塩基配列からなるDNAなどが挙げられる。

humanin類似ペプチドを完全にコードするDNAのクローニングの手

段としては、humanin類似ペプチドをコードするDNAの部分塩基配列を有する合成DNAフライヤーを用いてPCR法によってゲノムDNAやcDNAを増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNA (ライブラリー) をhumaninの一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いてラジオアイソトープや酵素で標識したもの (DNAプローブ) とのハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法等に従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の説明書に記載の方法に従って行なうことができる。

DNAの塩基配列の置換は、PCRや公知のキット、例えば、MutanTM-super Express kit (宝酒造 (株))、MutanTM-K (宝酒造 (株)) 等を用いて、ODA-LA PCR法やcupped duplex法やKunkel法等の公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。

クローニングされたhumanin類似ペプチドをコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有している。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

humanin類似ペプチドの発現ベクターは、例えば、(イ) humanin類似ペプチドをコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ) 該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド (例、pBR322、pBR325、pUC12、pUC13)、枯草菌由来のプラスミド (例、pUB110、pTP5、pC194)、酵母由来プラスミド (例、pSH19、pSH15)、アフタージ等のバクテリオファージ、レトロウイルス、ククシニアウイルス、バキュロウイルス等の動物ウイルス等の他、pA1-11、pXT1、

PRC/CMV, PRC/RSV, pCDNA1/Neo等が用いられる。

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SRαプロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーター、β-アクトニン等が挙げられる。

これらのうち、CMV (サイトメガロウイルス) プロモーター、SRαプロモーター等を用いるのが好ましい。宿主がエシエリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、λP_Lプロモーター、lppプロモーター、T7プロモーター等が、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーター等、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター等が好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーター等が好ましい。

発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン (以下、SV40oriと略称する場合がある) 等を含んでいるものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素 (以下、dhfrと略称する場合がある) 遺伝子 (メソトレキセート (MTX) 耐性)、アミノシリン耐性遺伝子 (以下、Amp^rと略称する場合がある)、ネオマイシン耐性遺伝子 (以下、Neo^rと略称する場合がある、Geneticin耐性) 等が挙げられる。特に、dhfr遺伝子欠損チヤイニースヘムスター細胞を用いて dhfr 遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、組換え体細胞をチミジンを含まない培地によっても選択できる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のポリペプチドのN端末側に付加する。宿主がエシエリヒア属菌である場合は、PhoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列等が、宿主がバチルス属菌である場合は、α-アミラーゼ・シグナル配列、サチリシン・シグナル配列等が、宿主が酵

母である場合は、MFα・シグナル配列、SUC2・シグナル配列等、宿主が動物細胞である場合には、インシエリン・シグナル配列、α-インテグロエロシ・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列等がそれぞれ利用できる。

このようにして構築された類似ベクターまたはその部分ベクターをコードするDNAを含むベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

宿主としては、例えば、エシエリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞等が用いられる。

エシエリヒア属菌の具体例としては、例えば、エシエリヒア・コリ (*Escherichia coli*) K12・DH1 (プロシージンズ・オゾ・ザ・ナショナル・アカデミー・オゾ・サイエンス・オゾ・ザ・ユエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 60巻, 160(1968)), JM103 (ヌクイレック・アジックス・リサーチ, (Nucleic Acids Research), 9巻, 309(1981)), JA221 (ジャーナル・オゾ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology), 120巻, 517(1978)), HB101 (ジャーナル・オゾ・モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459(1969)), C600 (ジェネティクス (Genetics), 39巻, 440(1954)) 等が用いられる。

バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サブチルス (*Bacillus subtilis*) M1114 (ジーン, 24巻, 255(1983)), 207-21 (ジャーナル・オゾ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 95巻, 87(1984)) 等が用いられる。

酵母としては、例えば、サッカロマイセス・セレビジエ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH22, AH22R⁺, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12, シンサッカロマイセス・ボンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) NCYC1913, NCYC2036, ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) KM71等が用いられる。

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、ヨトウガの幼虫由来株化細胞 (*Spodoptera frugiperda* cell: Sf細胞)、*Trichoplusia ni* の中腸由来のMG1細胞、*Trichoplusia ni* の卵由来のIlhgh FiveTM細胞、*Manestra*

- brassicaceae由来の細胞または*Estigmene acrea*由来の細胞等が用いられる。ウイ
ルスがBmNPVの場合は、カイコ由来株化細胞 (Bombyx mori N細胞; Bm
N細胞) 等が用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞(ATCC CRL1711
)、Sf21細胞 (以上、Vaughn, J.L.ら、*In Vivo*)、13,
213-217, (1977) 等が用いられる。

- 5 昆虫としては、例えば、カイコの幼虫等が用いられる (前田ら、*ネイチャー*
(Nature), 315巻, 592(1985))。

- 10 動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7, Vero, チャイニーズ
ハムスター細胞CHO (以下、CHO細胞と略記), dhfr遺伝子欠損チャ
イニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO(dhfr⁻)細胞と略記), マ
ウスL細胞, マウスA17-20, マウスミエローマ細胞, ラットGH3細胞,
ヒトFL細胞等が用いられる。

- 15 エシエリヒア属菌を形質転換するには、例えば、フロージーゾグズ・オゾ
・ザ・ナショナル・アカデミー・オゾ・サイエンス・オゾ・ザ・ユエスエ
ー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 69巻, 2110(1972)やジン
(Gene), 17巻, 107(1982)等に記載の方法に従って行なうことができ
る。

- 20 バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アソシエ
テッド・ジェネティクス (Molecular & General Genetics), 168巻, 11
1(1979)等に記載の方法に従って行なうことができる。

- 25 酵母を形質転換するには、例えば、メソジック・イン・エンザイモロジー (Methods
in Enzymology), 194巻, 182-187(1991)、フロージーゾグズ
・オゾ・ザ・ナショナル・アカデミー・オゾ・サイエンス・オゾ・ザ・ユ
エスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 75巻, 1929(1978)等
に記載の方法に従って行なうことができる。

- 昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオテクノロジー (Bio/Technology), 6, 47-55(1988)等に記載の方法に従って行な
うことができる。

- 動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊 8 新細胞工学実験ノ

- ロトコール, 263-267(1995) (秀潤社発行)、ウイルスロロジー (Virology
)、52巻, 456(1973)に記載の方法に従って行なうことができる。

- このようにして、ポリベクターをコードするDNAを含有する発現ベクター
で形質転換された形質転換体を得ることができる。

- 6 宿主がエシエリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培
養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体
の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源と
しては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、シロ糖等、窒素源
としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コブスチナー・リカー、

- 10 ベプトン、カゼイン、酵母エキス、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液等の
無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水
素ナトリウム、塩化マグネシウム等が挙げられる。また、酵母エキス、ビタミ
ン類、生長促進因子等を添加してもよい。培地のpHは約5~8が望ましい。

- 15 エシエリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザ
ミノ酸を含むM9培地 (ミラー (Miller), ジャーナル・オゾ・エクスペリメ
ンツ・イン・モレキュラー・ジェネティクス (Journal of Experiments in
Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New
York 1972) が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせ
るために、例えば、3-β-インドールアクリル酸のような薬剤を加えることが
できる。

- 20 宿主がエシエリヒア属菌の場合、培養は通常約15~43℃で約3~24時
間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

- 宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30~40℃で約6~24時間行
ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

- 25 宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バーク
ホルダー (Burkholder) 最小培地 (Bostian, K. L.ら、フロージーゾグズ・
オゾ・ザ・ナショナル・アカデミー・オゾ・サイエンス・オゾ・ザ・ユ
エスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77巻, 4505(1980)) や
0.5%カザミノ酸を含有するSD培地 (Bitter, G. A.ら、フロージーゾグズ

・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユ
ーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 81巻, 5330 (1984)
) が挙げられる。培地のpHは約5〜8に調整するのが好ましい。培養は通常
 約20〜35℃で約24〜72時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。
 宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、
 Grace's Insect Medium (Grace, I. C. C., ネイチャー (Nature), 195, 788 (1962)
) に非動化した10%フシ血清等の添加物を適宜加えたもの等が用いられる。
 培地のpHは約6.2〜6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃
 で約3〜5日間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約
 5〜20%の胎児牛血清を含むMEM培地 (サイエンス (Science), 122巻
 , 501 (1952)), DMEM培地 (サイロロジー (Virology), 8巻, 3
 96 (1959)), RPMI 1640培地 (ジャーナル・オブ・ザ・アメリカ
 ン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical
 Association) 199巻, 519 (1967)), 199培地 (プロシーディング
 オブ・ザ・ソサイエティ・オブ・ザ・バイオロジカル・メディシン (Proceeding
 of the Society for the Biological Medicine), 73巻, 1 (1950)) 等
 が用いられる。pHは約6〜8であるのが好ましい。培養は通常約30〜40
 ℃で約15〜60時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

以上のようにして、形質転換体の細胞内、細胞膜または細胞外 (好ましくは
 細胞外) にhumanin類似ペプチドを生成せしめることができる。

上記培養物からhumanin類似ペプチドを分離精製するには、例えば、
 下記の方法により行なうことができる。

humanin類似ペプチドを培養菌体あるいは細胞から抽出するに際して
 は、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸
 濁し、超音波、リゾチームおよび/または凍結融解等によって菌体あるいは細胞
 を破壊したのち、遠心分離やろ過によりhumanin類似ペプチドの粗抽
 出液を得る方法等が適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジン等の
 蛋白質変性剤や、トリトンX-100™等の界面活性剤が含まれていてもよい。

培養液中にhumanin類似ペプチドが分泌される場合には、培養終了後、
 公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれるhuman
 in類似ペプチドの精製は、公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なう
 ことができる。これらの公知の分離・精製法としては、塩析や溶媒沈殿法等の
 溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-
 リアクリルアミドゲル電気泳動法等の主として分子量の差を利用する方法、イ
 オン交換クロマトグラフィー等の荷電の差を利用する方法、フアイニエーク
 ロマトグラフィー等の特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグ
 ラフィー等の疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法等の等電点の差を
 利用する方法等が用いられる。

かくして得られるhumanin類似ペプチドが遊離体で得られた場合には、
 公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に
 塩で得られた場合には公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体ま
 たは他の塩に変換することができる。

なお、粗換え体が生ずるhumanin類似ペプチドを、精製前または精
 製後に適当な蛋白質修飾酵素または蛋白質分解酵素等を用いることにより、
 任意に修飾を加えたり、humanin類似ペプチドを部分的に除去すること
 もできる。これらの酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、ア
 ルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼ等が用い
 られる。

かくして生成するhumanin類似ペプチドの存在は、特異抗体を用いた
 エンザイムイムノアッセイやウエスタンブロット解析等により測定することが
 できる。

また、上述のとおり、humanin類似ペプチドのN末端またはC末端な
 どにエピトープ (抗体認識部位) となりうる任意の外來ペプチド配列 (例えば、
 FLAG, HISタグ, mycタグ, HAタグ, HSVタグなど) を融合させ、
 該ペプチド配列を認識する抗体を用いて、化学発光等を検出することにより、
 humanin類似ペプチドの存在を測定することも可能である。

humanin類似ペプチドは細胞死抑制作用、細胞生存維持作用などを有している。humanin類似ペプチドと受容体である本発明のFPR L1またはFPR L2は以下の用途を有している。

- すなわち、本発明は、本発明のFPR L1またはFPR L2とhumanin類似ペプチドとの結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物またはその塩（アミノ酸、アミノ酸塩など）のスクリーニング方法、および本発明のFPR L1またはFPR L2とhumanin類似ペプチドとの結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物またはその塩を含有する医薬を提供する。

- 本発明のFPR L1またはFPR L2を用いるか、または相換え型FPR L1またはFPR L2の発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、リガンドであるhumanin類似ペプチドと本発明のFPR L1またはFPR L2との結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物（例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など）またはその塩を効率よくスクリーニングすることができる。

- このような化合物には、(イ) FPR L1またはFPR L2を介して細胞刺激活性を有する化合物（いわゆる、本発明のFPR L1またはFPR L2に対するアミノ酸）、(ロ) FPR L1またはFPR L2を介する細胞刺激活性を阻害する化合物（いわゆる、本発明のFPR L1またはFPR L2に対するアミノ酸）、(ハ) humanin類似ペプチドと本発明のFPR L1またはFPR L2との結合力を増強する化合物、あるいは(ニ) humanin類似ペプチドと本発明のFPR L1またはFPR L2との結合力を減少させる化合物などが含まれる。

- 具体的には、本発明は、(i) 本発明のFPR L1またはFPR L2とhumanin類似ペプチドとを接触させた場合と(ii) 本発明のFPR L1またはFPR L2とhumanin類似ペプチドおよび試験化合物とを接触させた場合との比較を行なうことを特徴とするhumanin類似ペプチドと本発明のFPR L1またはFPR L2との結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

本発明のスクリーニング方法においては、(i) と(ii) の場合における、

例えば、FPR L1またはFPR L2に対するhumanin類似ペプチドの結合量、細胞刺激活性などを測定して、比較することと特徴とする。

- 細胞刺激活性としては、例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性などが挙げられるが、なかでも細胞内cAMP生成抑制活性が好ましい。

より具体的には、本発明は、

- a) 標識したhumanin類似ペプチドを、本発明のFPR L1またはFPR L2に接触させた場合と、標識したhumanin類似ペプチドおよび試験化合物を本発明のFPR L1またはFPR L2に接触させた場合における、標識したhumanin類似ペプチドの該FPR L1またはFPR L2に対する結合量を測定し、比較することと特徴とするhumanin類似ペプチドと本発明のFPR L1またはFPR L2との結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

- b) 標識したhumanin類似ペプチドを、本発明のFPR L1またはFPR L2を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合と、標識したhumanin類似ペプチドおよび試験化合物を本発明のFPR L1またはFPR L2を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識したhumanin類似ペプチドの該細胞または該膜画分に対する結合量を測定し、比較することと特徴とするhumanin類似ペプチドと本発明のFPR L1またはFPR L2との結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

- c) 標識したhumanin類似ペプチドを、本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したFPR L1またはFPR L2に接触させた場合と、標識したhumanin類似ペプチドおよび試験化合物を本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明のFPR L1またはFPR L2に接触させた場合における、標識したhumanin類似ペプチドの該FPR L1またはFPR L2に対する

る結合量を測定し、比較することを特徴とするhumanin類似ペプチドと本発明のFPR L1またはFPR L2との結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

- 5 d) 本発明のFPR L1またはFPR L2を活性化する化合物またはその塩 (例えば、humanin類似ペプチドなど) を本発明のFPR L1またはFPR L2を含有する細胞に接触させた場合と、本発明のFPR L1またはFPR L2を活性化する化合物またはその塩および試験化合物を本発明のFPR L1またはFPR L2を含有する細胞に接触させた場合における、FPR L1またはFPR L2を介した細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とするhumanin類似ペプチドと本発明のFPR L1またはFPR L2との結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、および

- 10 e) 本発明のFPR L1またはFPR L2を活性化する化合物またはその塩 (例えば、humanin類似ペプチドなど) を本発明のDNAを含有する形態転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明のFPR L1またはFPR L2に接触させた場合と、本発明のFPR L1またはFPR L2を活性化する化合物またはその塩および試験化合物を本発明のDNAを含有する形態転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明のFPR L1またはFPR L2に接触させた場合における、本発明のFPR L1またはFPR L2を介する細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とするhumaninと本発明のFPR L1またはFPR L2との結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

- 20 さらに、リガンドとしては、humanin類似ペプチドに代えて、humanin類似ペプチドとFPR L1またはFPR L2との結合性を変化させる化合物またはその塩は、FPR L1またはFPR L2との結合性を変化させる化合物またはその塩は、例えば、リガンドとしてhumanin類似ペプチドを用いて、後述する本発明のスクリーニング方法を実施することによって得ることができる。以下のスクリーニング方法においては、humanin類似ペプチドとFPR L1または

FPR L2との結合性を変化させる化合物またはその塩を含めて、単にhumanin類似ペプチドと表記する。

本発明のスクリーニング方法の具体的な説明を以下にする。

- 5 まず、本発明のスクリーニング方法に用いる本発明のFPR L1またはFPR L2としては、上記した本発明のFPR L1またはFPR L2を含有するものであれば何れのものであってもよいが、本発明のFPR L1またはFPR L2を含有する哺乳動物の臓器の細胞膜成分が好適である。しかし、特にヒト由来の臓器は入手が極めて困難なことから、スクリーニングに用いられるものとしては、相換え体を用いて大量発現させたヒト由来のFPR L1またはFPR L2などが適している。

- 10 本発明のFPR L1またはFPR L2を製造するには、上記の方法を用いられるが、本発明のDNAを哺乳細胞や昆虫細胞で発現することにより行なうことが好ましい。目的とする蛋白質部分をコードするDNA断片には相補DNAが用いられるが、必ずしもこれに制約されるものではない。例えば、遺伝子断片や合成DNAを用いてもよい。本発明のFPR L1またはFPR L2をコードするDNA断片を宿主動物細胞に導入し、それらを効率よく発現させるためには、該DNA断片を昆虫を宿主とするバキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス (nuclear polyhedrosis virus; NPV) のガリヘドリンプロモーター、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒトヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SRαプロモーターなどの下流に組み込むのが好ましい。

- 20 発現したレセプターの量と質の検査はそれ自体公知の方法で行うことができる。例えば、文献 (Numbi, P. 5, ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 267巻, 19555~19559頁, 1992年) に記載の方法に従って行なうことができる。

- 25 したがって、本発明のスクリーニング方法において、本発明のFPR L1またはFPR L2を含有するものとしては、それ自体公知の方法に従って精製したFPR L1またはFPR L2であってよいし、該FPR L1またはFPR L2を含有する細胞を用いてもよく、また該FPR L1またはFPR L2を含

有する細胞の膜面分を用いてもよい。

本発明のスクリーニング方法において、本発明のF P R L 1またはF P R L 2を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法はそれ自体公知の方法に従って行なうことができる。

本発明のF P R L 1またはF P R L 2を含有する細胞としては、該F P R L 1またはF P R L 2を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが好ましい。

細胞膜面分としては、細胞を破砕した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破砕方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーシングアレンダーやリトロン (Kinematica社製) のよる破砕、超音波による破砕、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破砕などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破砕液を低速 (500 ~ 3000 rpm) で短時間 (通常、約1 ~ 10分) 遠心し、上清をさらに高速 (15000 ~ 30000 rpm) で通常30分 ~ 2時間遠心し、得られる沈澱を膜面分とする。該膜面分中には、発現したF P R L 1またはF P R L 2と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

20 該F P R L 1またはF P R L 2を含有する細胞や膜面分中のF P R L 1またはF P R L 2の量は、1細胞当たり $10^3 \sim 10^6$ 分子であるのが好ましく、 $10^5 \sim 10^7$ 分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜面分当たりのリガンド結合活性 (比活性) が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

25 humanin類似ペプチドと本発明のF P R L 1またはF P R L 2との結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物またはその塩をスクリーニングする上記のa) ~ c) を実施するためには、例えば、適当なF P R L 1画分またはF P R L 2画分と、標識したhumanin類似ペプチドが必要である。

F P R L 1画分またはF P R L 2画分としては、天然型のF P R L 1画分ま

たはF P R L 2画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型F P R L 1画分またはF P R L 2画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などを示す。

6 標識したhumanin類似ペプチドとしては、例えば(^3H)、(^{125}I)、(^{14}C)、(^{35}S)などで標識されたhumanin類似ペプチドなどが用いられる。

10 具体的には、humanin類似ペプチドと本発明のF P R L 1またはF P R L 2との結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物またはその塩のスクリーニングを行なうには、まず本発明のF P R L 1またはF P R L 2を含有する細胞または細胞の膜面分を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することによりF P R L 1標品またはF P R L 2標品を調製する。バッファーには、 $\text{pH}4 \sim 10$ (望ましくは $\text{pH}6 \sim 8$) のリン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどのhumaninとF P R L 1またはF P R L 2との結合を阻害しないバッファーであればよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80TM (花王-アトラス社)、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによるレセプターやhumanin類似ペプチドの分解を抑える目的でPMSEF、ロイペプチン、E-64 (ペプチド研究所製)、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01 ~ 10 mlの該レセプター溶液に、一定量 (5000 ~ 50000 cpm) の標識したhumaninを添加し、同時に $10^{-4}\text{M} \sim 10^{-10}\text{M}$ の試験化合物を共存させる。非特異的結合量 (NSB) を知るために大過剰の未標識のhumanin類似ペプチドを加えた反応チューブも用意する。反応は約0 ~ 50°C、望ましくは約4 ~ 37°Cで、約20分 ~ 24時間、望ましくは約30分 ~ 3時間行う。

25 反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターまたはヤーカウンターで計測する。拮抗する物質がない場合のカウント(B_0)から非特異的結合量 (NSB) を引いたカウント ($\text{B}_0 - \text{NSB}$) を100%とした時、特異的結合量 ($\text{B} - \text{NSB}$) が、例えば、50%以下になる試験化合物を拮抗阻

査能力のある候補物質として選択することができる。

- humanin類似ペプチドと本発明のF P R L 1またはF P R L 2との結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物またはその塩をスクリーニングする上記のd)～e)の方法を実施するためには、例えば、F P R L 1またはF P R L 2を介する細胞刺激活性を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。

- 具体的には、まず、本発明のF P R L 1またはF P R L 2を含有する細胞をワルチウエルプレート等に培養する。スクリーニングを行なうにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファースに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質（例えば、cAMP、アラキドン酸など）の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP産生抑制などの活性については、フォールスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

- 細胞刺激活性を測定してスクリーニングを行なうには、適当なF P R L 1またはF P R L 2を発現した細胞が必要である。本発明のF P R L 1またはF P R L 2を発現した細胞としては、天然型の本発明のF P R L 1またはF P R L 2を有する細胞株、上記の組換え型F P R L 1またはF P R L 2を発現した細胞株などが望ましい。

- 試験化合物としては、例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが用いられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

試験化合物は塩を形成していてもよく、試験化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸など）や塩基（例、有機酸など）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など）との

塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、酪酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など）との塩などが用いられる。

- また、試験化合物としては、F P R L 1またはF P R L 2の活性部位の原子座標およびリガンド結合ポケットの位置に基づいて、リガンド結合ポケットに結合するように設計された化合物が好ましく用いられる。F P R L 1またはF P R L 2の活性部位の原子座標およびリガンド結合ポケットの位置の測定は、公知の方法あるいはそれに準じる方法を用いて行うことができる。

- humanin類似ペプチドとF P R L 1またはF P R L 2との結合性を変化させる化合物またはその塩がアミノトカアノグロニストであるかは、「humanin類似ペプチドとF P R L 1またはF P R L 2との結合性を変化させる化合物またはその塩をF P R L 1またはF P R L 2を含有する細胞に接触させた場合における、F P R L 1またはF P R L 2を介した細胞内cAMP生成抑制活性を測定すること」を特徴とするF P R L 1またはF P R L 2に対するアミノストの決定方法」を用いて確認することができる。

- 具体的には、F P R L 1またはF P R L 2に対するアミノスト決定方法は、本発明の組換え型F P R L 1またはF P R L 2の発現系を構築し、該発現系を用いたリセプター結合アッセイ系を用いることによって、F P R L 1またはF P R L 2を介する細胞内cAMP生成抑制活性を有する化合物またはその塩を決定する方法である。

より具体的には、

- (1) humanin類似ペプチドとF P R L 1またはF P R L 2との結合性を変化させる化合物またはその塩をF P R L 1またはF P R L 2を含有する細胞に接触させた場合における細胞内cAMP生成抑制活性を測定すること」を特徴とするF P R L 1またはF P R L 2に対するアミノストの決定方法、および
- (2) humanin類似ペプチドとF P R L 1またはF P R L 2との結合性を変化させる化合物またはその塩をF P R L 1 DNAまたはF P R L 2 DNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したF P R L 1またはF P R L 2に接触させた場合におけるF P R L 1またはF P R L 2を介

する細胞内cAMP生成抑制活性を測定することを特徴とするF P R L 1またはF P R L 2に対するアゾニストの決定方法である。

このアゾニスト決定方法において、F P R L 1またはF P R L 2を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリオンなどで固定化してもよい。固定化方法は公知の方法に従って行なうことができる。

F P R L 1またはF P R L 2を含有する細胞の膜画分としては、細胞を破碎した後、公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、フーリンゲンダーやバリトロン (Kinematic社製) による破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。細胞膜の画分には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速 (500~3000rpm) で短時間 (通常、約1~10分) 遠心し、上清をさらに高速 (15000~30000rpm) で通常30分~2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現したF P R L 1またはF P R L 2と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

F P R L 1またはF P R L 2を含有する細胞やその細胞膜画分中のF P R L 1またはF P R L 2の量は、1細胞当たり $10^3 \sim 10^6$ 分子であるのが好ましく、 $10^5 \sim 10^7$ 分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性 (比活性) が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

本発明のアゾニスト決定方法を実施するためには、F P R L 1またはF P R L 2を介する細胞内cAMP生成抑制活性を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。具体的には、まず、F P R L 1またはF P R L 2を含有する細胞をマルチウエルプレート等に培養する。アゾニスト決定を行なうにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適

当なベンツアレーンに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質 (例えば、cAMPなどの生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい)。

このアゾニスト決定方法を用いることによって、細胞内cAMP生成抑制活性を示す化合物をF P R L 1またはF P R L 2に対するアゾニストとして、細胞内cAMP生成抑制活性を示さない化合物をF P R L 1またはF P R L 2に対するアゾニストとして選択することができる。

humanin類似ペプチドと本発明のF P R L 1またはF P R L 2との結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キットは、本発明のF P R L 1またはF P R L 2、本発明のF P R L 1またはF P R L 2を含有する細胞、または本発明のF P R L 1またはF P R L 2を含有する細胞の膜画分を含有するものなどである。

本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものが挙げられる。

1. スクリーニング用試薬

a) 測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution (ギブコ社製) に、0.05%のウシ血清アルブミン (シグマ社製) を加えたもの。

孔径0.45 μ mのフィルターで滅菌減菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調整してもよい。

b) F P R L 1標品またはF P R L 2標品

本発明のF P R L 1またはF P R L 2を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに 5×10^4 個/穴で継代し、37℃、5%CO₂、95%airで2日間培養したもの。

c) 標識humanin類似ペプチド

市販の [³H]、[¹²⁵I]、[¹⁴C]、[³⁵S] などで標識したhumanin類似ペプチド水溶液の状態のものを4℃あるいは-20℃にて保存し、用時に測定用緩衝

液にて1 μ Mに希釈する。

d) humanin類似ペプチド標置液
humanin類似ペプチドを0.1%ツジ血清アルブミン(ツジマ社製)を含むPBSで1mMとなるように溶解し、-20℃で保存する。

5 2. 測定法

a) 12穴組織培養用プレートにて培養した本発明のFPR L1またはFPR L2発現CHO細胞を、測定用緩衝液1mlで2回洗浄した後、490 μ lの測定用緩衝液を各穴に加える。

b) 10⁻³~10⁻¹⁰Mの試験化合物溶液を5 μ l加えた後、標識humaninを5 μ l加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには試験化合物の代わりに10⁻³Mのhumanin類似ペプチドを5 μ l加えておく。

c) 反応液を除去し、1mlの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識humanin類似ペプチドを0.2N NaOH-1%SDSで溶解し、4mlの液体シンチレーターA(和光純薬製)と混合する。

d) 液体シンチレーショントラッキング(ベックマン社製)を用いて放射性を測定し、Percent Maximum Binding (PMB) を次の式で求める。

$$PMB = [(B - NSB) / (B_0 - NSB)] \times 100$$

PMB : Percent Maximum Binding

20 B : 検体を加えた時の値

NSB : Non-specific Binding (非特異的結合量)

B₀ : 最大結合量

25 本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、humanin類似ペプチドと本発明のFPR L1またはFPR L2との結合性またはシグナル伝達を変化させる作用を有する化合物またはその塩であり、具体的には、(イ) 本発明のFPR L1またはFPR L2を介して細胞刺激活性を有する化合物またはその塩(いわゆる、本発明のFPR L1またはFPR L2に対するアゴニスト)、(ロ) 該細胞刺激活性を有しない化合物またはその塩(いわゆる、本発明のFPR L1またはFPR

L2に対するアンタゴニスト)、(ハ) humanin類似ペプチドと本発明のFPR L1またはFPR L2との結合力を増強する化合物またはその塩、または(ニ) humanin類似ペプチドと本発明のFPR L1またはFPR L2との結合力を減少させる化合物またはその塩である。

6 本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物としては、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

10 該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸(例、無機酸など)や塩基(例、有機酸など)などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸(例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など)との塩、あるいは有機酸(例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、乳酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ペンゼンスルホン酸など)との塩などが用いられる。

15 本発明のFPR L1またはFPR L2に対するアゴニストは、humanin類似ペプチドが有する生理活性と同様の作用を有しているので、humanin類似ペプチドが有する生理活性に応じて安全で低毒性な医薬として有用である。

20 本発明のFPR L1またはFPR L2に対するアンタゴニストは、humanin類似ペプチドが有する生理活性を抑制することができるので、humanin類似ペプチドの生理活性を抑制するための安全で低毒性な医薬として有用である。

25 humanin類似ペプチドと本発明のFPR L1またはFPR L2との結合力を増強する化合物またはその塩は、humanin類似ペプチドが有する生理活性を増強するための安全で低毒性な医薬として有用である。

humanin類似ペプチドと本発明のFPR L1またはFPR L2との結合力を減少させる化合物またはその塩は、humanin類似ペプチドが有する生理活性を減少させるためのhumanin類似ペプチドの生理活性を抑制

するための安全で低毒性な医薬として有用である。

具体的には、本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られるアゴニストまたはhuman in 類似ベータドと本発明のFPR L1またはFPR L2との結合力を増強する化合物またはその塩は、例えば、細胞死抑制剤として、さらには、例えば神経変性を伴う疾病など、例えば、神経変性疾患（例、アルツハイマー病（家族性アルツハイマー病、若年性アルツハイマー病、孤発性アルツハイマー病など）、パーキンソン病、ダウソン症、筋萎縮性側索硬化症、プリオン病、クロイツフェルトヤコフ病、ハンチントン舞踏病、糖尿病性ニューロパチー、多発性硬化症など）、脳機能障害（例、脳梗塞、脳出血、クモ膜下出血、虚血性脳疾患、硬膜外血腫、硬膜下血腫など）、癌（例、星状細胞腫、乏枝神経腫瘍など）、免疫疾患、感染症（例、髄膜炎、原虫感染症、リケッチア感染症、後生動物感染症、Borna病などの細菌性またはウイルス性髄膜炎、ワクチン接種後脳炎、AIDS脳症など）、消化管疾患、循環器疾患、内分泌疾患等の種々の疾病の予防・治療剤、好ましくは神経変性疾患、脳機能障害の予防・治療剤として、さらに好ましくはアルツハイマー病の予防・治療剤として、低毒性で安全な医薬として使用することができる。

一方、上記スクリーニング方法で得られるアゴニストまたはhuman in 類似ベータドと本発明のFPR L1またはFPR L2との結合力を減少させる化合物またはその塩は、本発明のFPR L1またはFPR L2の発現過多に起因する疾患の予防・治療剤などの医薬として使用することができる。

さらに、上記スクリーニング方法で得られるアゴニストのうち、 β -アミロイド（1-42）とFPR L1との結合を阻害するものは、例えば、細胞死抑制剤として、さらには、例えば神経変性を伴う疾病など、例えば、神経変性疾患（例、アルツハイマー病（家族性アルツハイマー病、若年性アルツハイマー病、孤発性アルツハイマー病など）、パーキンソン病、ダウソン症、筋萎縮性側索硬化症、プリオン病、クロイツフェルトヤコフ病、ハンチントン舞踏病、糖尿病性ニューロパチー、多発性硬化症など）、脳機能障害（例、脳梗塞、脳出血、クモ膜下出血、虚血性脳疾患、硬膜外血腫、硬膜下血腫など）、癌（

例、星状細胞腫、乏枝神経腫瘍など）、免疫疾患、感染症（例、髄膜炎、原虫感染症、リケッチア感染症、後生動物感染症、Borna病などの細菌性またはウイルス性髄膜炎、ワクチン接種後脳炎、AIDS脳症など）、消化管疾患、循環器疾患、内分泌疾患等の種々の疾病の予防・治療剤、好ましくは神経変性疾患、脳機能障害の予防・治療剤として、さらに好ましくはアルツハイマー病の予防・治療剤として、低毒性で安全な医薬として使用することができる。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩を上記の医薬組成物として使用する場合、常套手段に従って製剤化することができる。

例えば、該化合物またはその塩は、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクログラブセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物またはその塩を生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ペヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアガムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記タプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなペヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、

例えば、アルコール (例、エタノール)、ポリアルコール (例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール)、非イオン性界面活性剤 (例、ポリソルベート 80™、HCO-50) などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

また、上記予防・治療剤は、例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液)、無痛化剤 (例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど)、安定剤 (例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど)、保存剤 (例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど)、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンブアルに充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物 (例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ウタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど) に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、アルツハイマー病患者 (体重 60 kg として) においては、一日につき F P R L1 または F P R L2 に対するアミノ酸を約 0.1 ~ 100 mg、好ましくは約 1.0 ~ 50 mg、より好ましくは約 1.0 ~ 20 mg である。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、アルツハイマー病患者 (体重 60 kg として) においては、一日につき F P R L1 または F P R L2 に対するアミノ酸を約 0.01 ~ 30 mg 程度、好ましくは約 0.1 ~ 20 mg 程度、より好ましくは約 0.1 ~ 10 mg 程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重 60 kg 当りに換算した量を投与することができる。

本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。ま

たアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければ示すものとする。

DNA	: デオキシリボ核酸
cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
A	: アデニン
T	: チミン
G	: グアニン
C	: シトシン
RNA	: リボ核酸
mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
dTTP	: デオキシチミジン三リン酸
dGTP	: デオキシグアニン三リン酸
dCTP	: デオキシシチジン三リン酸
ATP	: アデノシン三リン酸
EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム
Gly	: グリシン
Ala	: アラニン
Val	: バリン
Leu	: ロイシン
Ile	: イソロイシン
Set	: セリン
Thr	: スレオニン
Cys	: シスチニン
Met	: メチオニン
Glu	: グルタミン酸
Asp	: アスパラギン酸
Lys	: リジン

Arg	: アルギニン
His	: ヒスチジン
Phe	: フェニルアラニン
Tyr	: チロシン
Trp	: トリプトファン
Pro	: プロリン
Asn	: アスパラギン
Gln	: グルタミン
PGlu	: ピログルタミン酸
*	: 終止コドンに対応する
Me	: メチル基
Et	: エチル基
Bu	: ブチル基
Ph	: フェニル基
TC	: チアノリジン-4 (R) -カルボキサミド基

16 また、本明細書中で採用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表配する。

Tos	: p-トルエンシルフオニル
CHO	: ホルミル
Bzl	: ベンジル
Cl ₂ Bzl	: 2, 6-ジクロロベンジル
Bom	: ベンジルオキシメチル
Z	: ベンジルオキシカルボニル
Cl-Z	: 2-クロロベンジルオキシカルボニル
B-Z	: 2-ブロモベンジルオキシカルボニル
Boc	: t-ブトキシカルボニル
DNP	: ジニトロフェノール
Trt	: トリチル
Bum	: t-ブトキシメチル

Fmoc	: N-9-フルオレニルメトキシカルボニル
HOBt	: 1-ヒドロキシベンズトリアゾール
HOObt	: 3, 4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ-1, 2, 3-ベンゾトリアジン
HONB	: 1-ヒドロキシ-5-ホルボルネン-2, 3-ジカルボキシイミド
DCC	: N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド
Pbf	: 2, 2, 4, 6, 7-ペンタメチルジヒドロベンゾフラノン-5-スルホニル
tBu	: 第3ブチル
TFA	: トリフルオロ酢酸
HOAt	: 1-ヒドロキシ-7-アザベンゾトリアゾール
PyAop	: 7-アザベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリス ピロリジノホスホニウム ヘキサフルオロホスファイト
DIPCDI	: 1, 3-ジイソプロピルカルボジイミド
Fmoc-Leu-Ser (Psi (Me, Me) pro) -OH : (4S) -3-(Fmoc-Leu)-2, 2-ジメチルオキサソリジン-4-カルボキシル酸 [(4S) -3-(Fmoc-Leu)-2, 2-dimethylloxazolidine-4-carboxylic acid]]	

16 本明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

[配列番号: 1]
ヒト由来FPR L1のアミノ酸配列を示す。

20 [配列番号: 2]
ヒト由来FPR L1をコードするcDNAの塩基配列を示す。

[配列番号: 3]
参考例1で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

25 [配列番号: 4]
参考例1で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号: 5]
参考例1で得られたhuman in類似ペプチドをコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：6〕

参考例1で得られたhumanin類似ペプチド(HN3)のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：7〕

5 参考例1で用いられたクエリーの塩基配列を示す。

〔配列番号：8〕

参考例1で得られた配列番号：7を含むDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：9〕

10 参考例1で得られたhumanin類似ペプチドNH3〔配列番号：6〕の部分ペプチドのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：10〕

配列番号：9をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：11〕

ヒト型humanin(1-24)のアミノ酸配列を示す。

15 〔配列番号：12〕

〔Gly¹〕-ヒト型humanin(1-24)のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：13〕

ヒト型humanin(1-21)のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：14〕

20 ラット型humanin(1-38)のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：15〕

ラット型humanin(1-24)のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：16〕

ラット型humanin(1-21)のアミノ酸配列を示す。

25 〔配列番号：17〕

ラット由来FPR1のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：18〕

ラット由来FPR1をコードするcDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：19〕

マウス由来FPR2(FPR1)のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：20〕

マウス由来FPR2(FPR1)をコードするcDNAの塩基配列を示す。

5 〔配列番号：21〕

ヒト由来FPR2のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：22〕

ヒト由来FPR2をコードするcDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：23〕

10 参考例5で用いたグライマー1の塩基配列を示す。

〔配列番号：24〕

参考例5で用いたグライマー2の塩基配列を示す。

〔配列番号：25〕

参考例6で用いたグライマー3の塩基配列を示す。

15 〔配列番号：26〕

参考例6で用いたグライマー4の塩基配列を示す。

〔配列番号：27〕

参考例6で用いたグライマー5の塩基配列を示す。

〔配列番号：28〕

20 参考例6で用いたグライマー6の塩基配列を示す。

〔配列番号：29〕

参考例6で用いたグライマー7の塩基配列を示す。

〔配列番号：30〕

参考例6で用いたグライマー8の塩基配列を示す。

25 〔配列番号：31〕

W-Peptideのアミノ酸配列を示す。

後述の参考例1で得られた形質転換体 *Escherichia coli* TOP10/pcdNA-hn3 は、2001年7月19日から日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6 (郵便番号305-8566) の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生

物寄託センターに受託番号 FERM B-7674として、2001年7月3日から日本国大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号（郵便番号532-8686）の財団法人発酵研究所（IFO）に受託番号IFO 16673として寄託されている。

後述の参考例6で得られた形質転換体 *Escherichia coli* JM109/pUC18-rFRL1は2003年1月10日から茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号305-8566）の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託番号FERM B-8274として寄託されている。

10 実施例

以下に参考例および実施例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。なお、大腸菌を用いての遺伝子は、モレキュラー・クローニング（Molecular cloning）に記載されている方法に従った。

15 参考例 1

配列番号：7で表されるとhumanin遺伝子コード領域をクエリーにしてGENBANKに対してデータベースサーチを行ったところ、アクセシオン番号AL356135の配列中にhumanin遺伝子のコード領域に対応した開始および終止コドンを含むhumanin遺伝子に類似した遺伝子領域が存在することが見出された。この遺伝子が実質に存在し、また転写されて機能していることを確認するため、ヒト全脳polyA RNA（クロンテック社）1.0μgを鋳型に、SuperScript reverse transcriptase（ギブコ BRL社）を用い、マニエールにしたがって、oligo (dT) プライマーを用いて逆転写を行ってcDNAを作成し、アクセシオン番号AL356135の配列中のhumanin類似配列のコード領域の5' 上流および3' 下流に相当する順に、TACCGTACCGTGCAAGTAGCATG（配列番号：3）、GTGGCGCTATTCGGTGTTGTCATTGC（配列番号：4）のプライマーを設定して20μlの液量でPCR反応を行った。組成は、cDNA調製液から10ng mRNA相当分を鋳型に両primer 0.5μM, 2.5mM MgCl₂, dNTP 0.2mM, AmpliTaq Gold（ペーキンエルマー社）1/100 volume、10倍濃縮AmpliTaq Gold Buffer 1/10 volume

で行った。反応は、95℃で10分保温した後、95℃15秒、67℃15秒、72℃15秒のサイクルを40回繰り返した後、72℃で5分保温した。得られた反応液を用い、Eukaryotic TOP0 TA cloning kit（インビトロジェン社）を用いてプラスミドベクターpCDNA3.1/V5/His-TOPOへサブクローニングし、大腸菌TOP10へ導入した。生じた形質転換体からQIA prep8 mini prep（キアゲン社）を用いてプラスミドDNAを精製した。塩基配列決定のための反応は、BigDye Terminator Cycle Sequence Ready Reaction Kit（ペーキンエルマー社）を用いて行い、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読した。その結果、検索で見出されたhumanin類似配列のコード領域（配列番号：5）を含む配列番号：8で表される塩基配列が得られたことから、この遺伝子がヒト全脳において発現していることが確認された。

この配列には、humanin類似配列のコード領域全長が含まれていたため、上記プラスミドで大腸菌TOP10を形質転換して、*Escherichia coli* TOP10/pCDNA-hn3を得た。

15 参考例 2

配列番号：6で表されるアミノ酸配列を含有するHumanin類似ペプチド（HN3）を以下の方法で製造した。

市販の2-chlorotriyl resin (Clt resin, 1.33 mmol/g) にFmoc-Thr(tBu)-OHを導入したFmoc-Thr(tBu)-O-Clt resin (0.527 mmol/g) 0.25 mmol分をペプチド合成機ABI 433A の反応槽に入れ、Fmoc/DCC/HOBt法を用い、固相合成を行った。Fmocアミノ酸の側鎖保護基はArgにはPbf基、LysにBoc基、Asp, Thr, SerにtBu基、CysにTrt基を用いた。他のアミノ酸は側鎖無保護のものを用い、上記に示す配列の13位Thrまでペプチド鎖を伸長した。得られたFmoc-humanin類似ペプチド(13-24)-O-Clt resinにFmoc-Leu-Ser(Psi(Me, Me)pro)-OH（NOVA社製、製品番号05-20-1004）をDIPCDI/HOBtで導入した後、10位LeuからN末端側へ配列順にDCC/HOBtで導入し、目的の保護ペプチド樹脂を得た。

この樹脂100 mgをTFA, thioanisole, m-cresol, 水, triisopropylsilane, ethanedithiol (80:5:5:5:2:5:2:5) の混合液 (total 1.5 ml) で室温、1.5時間攪拌した後、反応溶液にエーテルを加え、白色粉末を析出させ遠心分離後、上清

を除く操作を3回繰り返した。残渣を水で抽出後、凍結乾燥し白色粉末を得た。得られた粗ペプチドをYMC Pack R&D-ODS-5-B S-5、120Åカラム(30 x 250mm)を用いた分取HPLCで、A液: 0.1%TFA-水、B液: 0.1%TFA含有アセトニトリルによるA/B: 78/22→68/32への直線型濃度勾配溶出(60分)を行ない、目的物を含む分画を集め凍結乾燥し白色粉末21.8 mgを得た。

ESI-MS: M⁺ 2692.8 (理論値 2692.5)

HPLC溶出時間 10.5分

溶出条件

カラム YMC AM 301 (4.6 x 100mm)

10 溶離液 A液: 0.1%TFA-水、B液: 0.1%TFA含有アセトニトリルを用い、A/B: 80/20

～30/70→ 直線型濃度勾配溶出(25分)

流速 1.0ml/分

参考例 3

15 humanin類似ペプチドによるラット副腎髄質由来褐色細胞腫細胞PC12hに対するグルタミン酸誘発細胞死抑制活性

コラーゲンコート済み96ウェルプレート(1WAKI)に10%フシ胎児血清および5%馬血清を含むDulbecco modified Eagle's medium (以下、DMEM)を培地としてPC12h細胞(大阪大学蛋白質研究所・島中寛教授より供与、Hatanaka, H., Brain Research, 222巻、225-233頁、1981年)を2 x 10⁶ cells/cm²の細胞密度でまいた。24時間後に100 μlの20 mM HEPES (pH 7.5)を含むDMEMに培地を交換し、同時に、各種濃度の実施例2で製造したhumanin類似ペプチド(配列番号: 4)および添加後の濃度が1 mMとなるようにグルタミン酸を添加した。72時間後に0.2% Tween20を含むphosphate buffered saline 100 μlを用いて細胞を溶解し、抽出液の乳酸脱水酵素(LDH)活性をLDH Cytotoxic Test WAKO (和光純薬)によって測定した。結果を図1に示す。

25 グルタミン酸処理72時間後において、humanin類似ペプチド無添加区の細胞生存率が34.0%であったのに対し、humanin類似ペプチドを1 μMまたは10 μM添加することにより、細胞生存率は、それぞれ59.3%または74.6%に上昇した。なお、細胞生存率は、グルタミン酸無添加区を100%としたときの比率によって表わす。

これより、humanin類似ペプチドにより、ラット副腎髄質由来褐色細胞腫細胞PC12hのグルタミン酸誘発細胞死が抑制されることが明らかである。

参考例 4

Humanin類似ペプチド(19-24) (配列番号: 9):

Pro-Val-Lys-Arg-Arg-Thrの製造

6 Fmoc-Thr(tBu)-O-Clt resinを用い、目的配列の保護ペプチド樹脂を調製し、実施例2に記載のhumanin類似ペプチドの精製法と同様の方法により精製して白色粉末29 mgを得た。

ESI-MS: M⁺ 756.5 (理論値 756.5)

10 HPLC溶出時間 10.2分

溶出条件

カラム YMC AM 301 (4.6 x 100mm)

溶離液 A液: 0.1%TFA-水、B液: 0.1%TFA含有アセトニトリルを用い、A/B: 80/20

～30/70→ 直線型濃度勾配溶出(25分)

15 流速 1.0ml/分

参考例 5 マウス脾臓由来FRL2をコードするcDNAのクローニングと発現ベクターの構築

マウス脾臓cDNA (Marathon-Ready™ cDNA: Clontech社)を鋳型として、マウスFRL2の配列情報(Accession #071180:NCBI)をもとに設計した2個のプライマー、プライマー1 (配列番号: 23) 及びプライマー2 (配列番号: 24) を用いてPCRを行なった。PCRにはPyrobest DNA polymerase (宝酒造)を用い、①98℃・1分の後、②98℃・10秒、55℃・30秒、72℃・60秒を35回の後、③72℃・2分の伸長反応を行なった。反応後、増幅産物を制限酵素SalI及びXbaIで切断した後、プラスミドベクターPAKKO-111Hに挿入して発現ベクターを構築した。その塩基配列を解析した結果、配列番号: 19で表されるアミノ酸配列からなるマウスFRL2をコードするcDNA配列 (配列番号: 20) を得た。

25 参考例 6 ラット脾臓由来FRL1をコードするcDNAのクローニングと

その塩基配列の決定及び発現ベクターの構築

- ラット脾臓mRNAからMarathon™ cDNA Amplification Kit (Clontech社) を用いてcDNAを合成し、その末端にアダプターを付加した。これを鋳型として、2個のプライマー、プライマー3 (配列番号: 25) 及びプライマー4 (配列番号: 26) を用いてPCRを行なった。PCRにはAdvantage 2 Polymerase mix (Clontech社) を使い、①96℃・1分、②96℃・10秒、72℃・2分を5回、③96℃・10秒、70℃・2分を5回、④96℃・10秒、68℃・2分を25回の後、⑤72℃・5分の伸長反応を行なった。反応後、増幅産物をTOPO TA Cloning Kit (Invitrogen社) の処方にしたがってプラスミドベクターpCR2.1 TOPO (Invitrogen社) に挿入し、これを大腸菌JM109 (宝酒造) に導入してクローニングした。個々のクローニングの塩基配列を解析した結果、新規G蛋白質共役型セプター蛋白質の一部をコードするcDNA配列を得た。この配列情報をもとに2個のプライマー、プライマー5 (配列番号: 27) 及びプライマー6 (配列番号: 28) を設計し、上述のラット脾臓mRNAから合成したcDNAを鋳型としてMarathon™ cDNA Amplification Kit (Clontech社) の処方に従ってそれぞれ5'-RACE及び3'-RACEを行なった。PCRは上述のものと同様に行ない、反応後増幅産物をTOPO TA Cloning Kit (Invitrogen社) の処方にしたがってプラスミドベクターpCR2.1 TOPO (Invitrogen社) に挿入し、これを大腸菌JM109 (宝酒造) に導入してクローニングした。個々のクローニングの塩基配列を解析した結果、新規G蛋白質共役型セプター蛋白質の一部をコードするcDNA配列を得た。これらの配列情報からさらに2個のプライマー、プライマー7 (配列番号: 29) 及びプライマー8 (配列番号: 30) を設計し、上述のラット脾臓mRNAから合成したcDNAを鋳型としてPCRを行なった。PCRにはPyrobest DNA polymerase (宝酒造) を使い、①98℃・1分の後、②98℃・10秒、55℃・30秒、72℃・60秒を35回の後、③72℃・2

- 分の伸長反応を行なった。反応後、増幅産物を制限酵素Sal I及びXba Iで切断した後、プラスミドベクターpAKKO-111Hに挿入して発現ベクターを構築した。これを制限酵素Sal I及びNhe Iで切断して挿入断片を切り出し、プラスミドベクターpUC119に挿入してこれらの塩基配列を解析した結果、配列番号: 17で表されるアミノ酸配列からなるラットの新規G蛋白質共役型セプター蛋白質をコードするcDNA配列 (配列番号: 18) を得た。このcDNAより導き出されるアミノ酸配列 (配列番号: 17) を含有する新規タンパク質をラットFPR1と命名した。また、このプラスミドを保持する形質転換体を、大腸菌 (*Escherichia coli*) JM109/pUC119-rFPR1と命名した。

参考例7 ラット脾臓由来FPR1をコードするcDNAを含有するプラスミドの作製

- 参考例6で得られた発現ベクターを制限酵素Sal I及びNhe Iで切断して挿入断片を切り出し、プラスミドベクターpUC18に挿入してこれらの塩基配列を解析した結果、参考例5と同様に配列番号: 17で表されるアミノ酸配列からなるラットの新規G蛋白質共役型セプター蛋白質をコードするcDNA配列 (配列番号: 18) であることが確認できた。また、このプラスミドを保持する形質転換体を、大腸菌 (*Escherichia coli*) JM109/pUC18-rFPR1と命名した。

- 実施例1 FPR1-GFPを発現させたCHO細胞における、ホルスコリン添加によって増加させた細胞内cAMP量のhuman in類似ベナチド (HN3) (配列番号: 6) による抑制

FPR1-GFPを発現させたCHO細胞をアッセイ用培地 (HBSSに0.1%ウシ血清アルブミン、および、0.2mM IBMXを添加したもの) にて洗浄した後、37℃、5%CO₂条件下で30分培養した。アッセイ用培地にて希釈したを濃度のHN3、およびフォルスコリンを1μMとなるように添加した。37℃、5%CO₂条件下で30分培養した。培養上清を捨てて、cAMP screen kit (アライババイオシステムズ社) のプロトコルに従い、細胞内のcAMP量をプレートリーダー (ARVO sマルチラベ

ルカウンター、Wallac社)を用いて測定した。

その結果、ベクターのみを導入したCHO細胞(mock)に比べ(図3)、FPR L1-GFP遺伝子を導入したCHO細胞特異的に、ホルスコリン添加によって増加させた細胞内cAMP量のHN3による用量依存的特異的な減少が検出された(図2)。

実施例2 エトFPR1発現CHO細胞(No. 14)、エトFPR L1発現CHO細胞(No. 8)、エトFPR L2発現CHO細胞(No. 17)、マウスFPR L2(No. 15)およびラットFPR L1発現CHO細胞(No. 15)における、ホルスコリン添加によって増加させた細胞内cAMP量の各

10 アゴニストによる抑制

上記の受容体を発現させたCHO細胞をアッセイ用培地(HBSS (GibcoBRL)に0.1%ウシ血清アルブミン、および、0.2mM IBMXを添加したもの)にて洗浄した後、37℃、5%CO₂条件下で30分培養した。アッセイ用培地にて希釈した各濃度のhuman in類似ペプチド(HN3)、その後ホルスコリン1μMとなるように添加した。37℃、5%CO₂条件下で30分培養した。培養上清を捨て、cAMP screen kit (アライドバイオシステムズ社)のプロトコールに従い、細胞内のcAMP量をプレートリーダー(ARVO s xマルチラベルカウンター、Wallac社)を用いて測定した。ホルスコリン1μM添加した細胞におけるcAMPの産生量を100%とし、ホルスコリンを添加していない細胞のcAMP産生量を0%として、各アゴニストを添加したときのcAMP量を%表示した。cAMP産生量を50%阻害する濃度(EC₅₀)を、logit-logプロットより算出した。結果、HN3はhFPR L1に対してのみでなく、hFPR L2に対しても強く反応すること、また、mFPR L2およびrFPR L1に対しても反応することが分かった(図4)。

25

産業上の利用可能性

本発明のFPR L1、FPR L2、その部分ペプチドまたはその塩とhuman in類似ペプチドを用いることによって、human in類似ペプチドと本発明のFPR L1、FPR L2、その部分ペプチドまたはその塩と

の結合性を変化させる化合物を効率良くスクリーニングすることができる。

請求の範囲

1. (1) 配列番号：1、配列番号：17、配列番号：19または配列番号：21で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩および(2) humanin類似ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする該レセプター蛋白質またはその塩とhumanin類似ペプチドまたはその塩との結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

10 2. humanin類似ペプチドが、

- (1) 配列番号：6で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩、または
(2) 配列番号：6で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列中の連続する6〜20個のアミノ酸からなるペプチドまたはその塩である請求項1記載のスクリーニング方法。

15 3. humanin類似ペプチドが、

- (1) a) 配列番号：6で表されるアミノ酸配列、b) 配列番号：6で表されるアミノ酸配列中の1〜10個のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、c) 配列番号：6で表されるアミノ酸配列に1〜10個のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、d) 配列番号：6で表されるアミノ酸配列中の1〜5個のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、またはe) これらの欠失・付加・置換を組み合わせたアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはその塩、または

- (2) a) 配列番号：6で表されるアミノ酸配列の第19番目〜24番目、第5番目〜24番目、第1番目〜20番目、第5番目〜20番目、第1番目〜21番目、もしくは第5番目〜21番目のアミノ酸配列、b) 該アミノ酸配列中の1〜6個のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、c) 該アミノ酸配列に1〜6個のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、d) 該アミノ酸配列中の1〜6個のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、e) またはこれらの欠失・付加・置換を組み合わせたアミノ酸配列からなり、アミノ酸の数が6〜20個

であるペプチド(ただし、配列番号：11または配列番号：12で表されるアミノ酸配列の第19番目〜24番目、第5番目〜24番目、第1番目〜20番目、第5番目〜20番目、第1番目〜21番目または第5番目〜21番目のアミノ酸配列からなるペプチドを除く) またはその塩である請求項1記載のスクリーニング方法。

6 4. humanin類似ペプチドが、

- (1) 配列番号：6で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはその塩、または

10 (2) 配列番号：6で表されるアミノ酸配列の第19番目〜24番目、第5番目〜24番目、第1番目〜20番目、第5番目〜20番目、第1番目〜21番目、もしくは第5番目〜21番目のアミノ酸配列からなるペプチドまたはその塩である請求項1記載のスクリーニング方法。

15 5. (1) 配列番号：1、配列番号：17、配列番号：19または配列番号：21で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩および(2) humanin類似ペプチドを含有することを特徴とする該レセプター蛋白質またはその塩とhumanin類似ペプチドまたはその塩との結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物またはその塩のスクリーニングキット。

20 6. 請求項1記載のスクリーニング方法または請求項5記載のスクリーニングキットを用いて得られうる、humanin類似ペプチドまたはその塩と配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物またはその塩。

25 7. アゴニストである請求項6記載の化合物。

8. アンタゴニストである請求項6記載の化合物。

9. humanin類似ペプチドまたはその塩と配列番号：1、配列番号：17、配列番号：19または配列番号：21で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白共役型レセプター蛋白質

質またはその塩との結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬。

10. 請求項7記載のアミノストを含有してなる神経変性疾患もしくは脳機能障害の予防・治療剤。

11. アルツハイマー病、パーキンソン病、ダウン症、筋萎縮性側索硬化症、プリオン病、クロイツフェルト・ヤコブ病、ハンチントン舞蹈病、糖尿病性ニューロパチー、多発性硬化症、脳梗塞、脳出血、クモ膜下出血、虚血性脳疾患、硬膜外血腫または硬膜下血腫の予防・治療剤である請求項10記載の予防・治療剤。

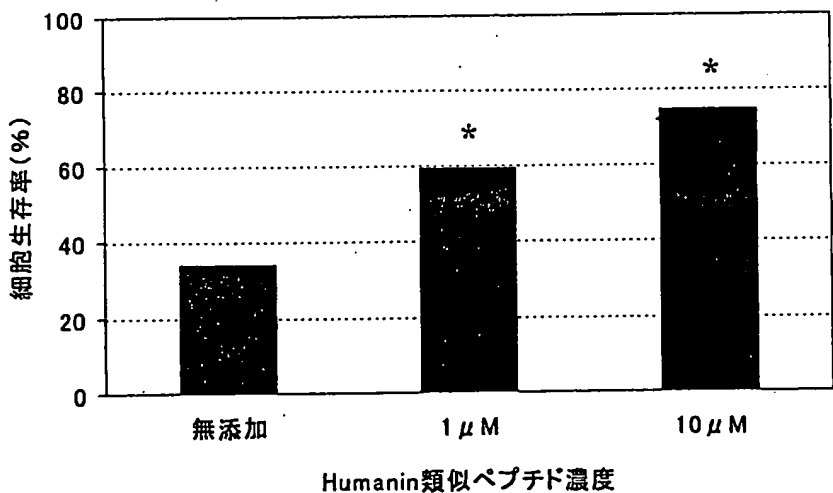
12. 請求項7記載のアミノストを含有してなる細胞死抑制剤。

13. (1) 配列番号：1、配列番号：17、配列番号：19または配列番号：21で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型セブター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩および(2) humanin類似ペプチドまたはその塩と該セブター蛋白質またはその塩との結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物またはその塩を用いることを特徴とする該セブター蛋白質またはその塩に対するアミノストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法。

14. 哺乳動物に対して、請求項7記載のアミノストの有効量を投与することと特徴とする (i) 神経変性疾患もしくは脳機能障害の予防・治療方法、(ii) アルツハイマー病、パーキンソン病、ダウン症、筋萎縮性側索硬化症、プリオン病、クロイツフェルト・ヤコブ病、ハンチントン舞蹈病、糖尿病性ニューロパチー、多発性硬化症、脳梗塞、脳出血、クモ膜下出血、虚血性脳疾患、硬膜外血腫または硬膜下血腫の予防・治療方法または (iii) 細胞死抑制方法。

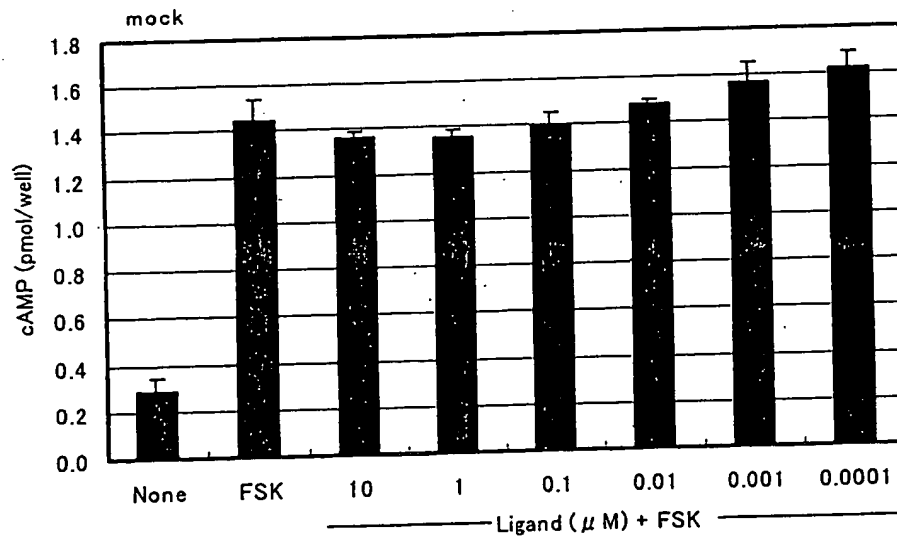
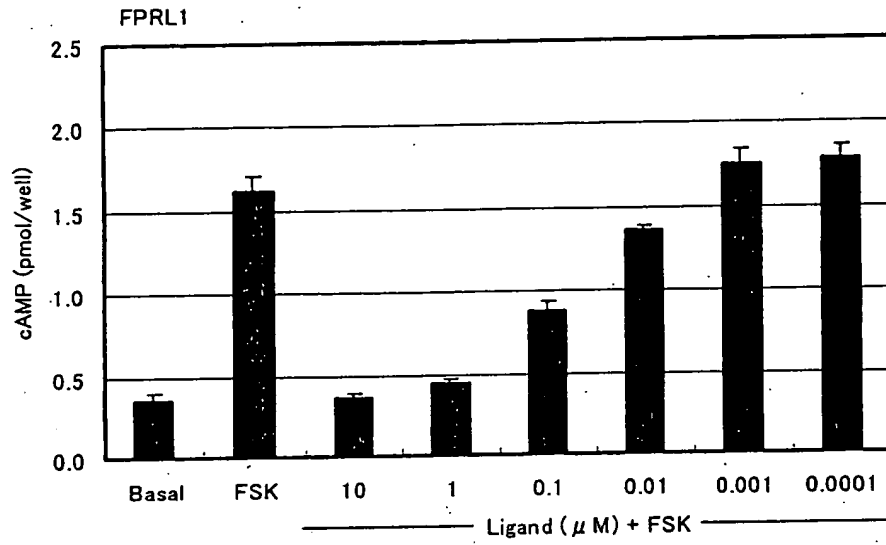
15. (i) 神経変性疾患もしくは脳機能障害の予防・治療剤、(ii) アルツハイマー病、パーキンソン病、ダウン症、筋萎縮性側索硬化症、プリオン病、クロイツフェルト・ヤコブ病、ハンチントン舞蹈病、糖尿病性ニューロパチー、多発性硬化症、脳梗塞、脳出血、クモ膜下出血、虚血性脳疾患、硬膜外血腫または硬膜下血腫の予防・治療剤または (iii) 細胞死抑制剤を製造するための請求項7記載のアミノストの使用。

図 1



2/4

2



3/4

3

4/4

4

SEQUENCE LISTING

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Novel Screening Method

<130> 3072W00P

<150> JP 2002-205554

<151> 2002-07-15

<160> 31

<210> 1

<211> 351

<212> PRT

<213> Human

<400> 1

Met Glu Thr Asn Phe Ser Thr Pro Leu Asn Glu Tyr Glu Glu Val Ser

5

10

15

Tyr Glu Ser Ala Gly Tyr Thr Val Leu Arg Ile Leu Pro Leu Val Val

20

25

30

Leu Gly Val Thr Phe Val Leu Gly Val Leu Gly Asn Gly Leu Val Ile

35

40

45

Trp Val Ala Gly Phe Arg Met Thr Arg Thr Val Thr Thr Ile Cys Tyr

50

55

60

Leu Asn Leu Ala Leu Ala Asp Phe Ser Phe Thr Ala Thr Leu Pro Phe

65

70

75

80

Leu Ile Val Ser Met Ala Met Gly Glu Lys Trp Pro Phe Gly Trp Phe

85

90

95

Leu Cys Lys Leu Ile His Ile Val Val Asp Ile Asn Leu Phe Gly Ser

100

105

110

Val Phe Leu Ile Gly Phe Ile Ala Leu Asp Arg Cys Ile Cys Val Leu

115

120

125

EC ₅₀ Values (nM)			
Sample	hFPRL1(No.14)	hFPRL1(No.8)	hFPRL2(No.17)
HN3	>10000	14	110
W-Peptide	0.14	0.027	>10000
β -Amyloid(1-42)	>10000	1200	>10000

EC ₅₀ Values (nM)		
Sample	mFPRL2(No.15)	rFPRL1(No.15)
HN3	370	650
W-Peptide	0.063	0.12
β -Amyloid(1-42)	170	>10000

His Pro Val Trp Ala Gln Asn His Arg Thr Val Ser Leu Ala Met Lys
130 135 140
Val Ile Val Gly Pro Trp Ile Leu Ala Leu Val Leu Thr Leu Pro Val
145 150 155 160
Phe Leu Phe Leu Thr Thr Val Thr Ile Pro Asn Gly Asp Thr Tyr Cys
165 170 175
Thr Phe Asn Phe Ala Ser Trp Gly Gly Thr Pro Glu Glu Arg Leu Lys
180 185 190
Val Ala Ile Thr Met Leu Thr Ala Arg Gly Ile Ile Arg Phe Val Ile
195 200 205
Gly Phe Ser Leu Pro Met Ser Ile Val Ala Ile Cys Tyr Gly Leu Ile
210 215 220
Ala Ala Lys Ile His Lys Lys Gly Met Ile Lys Ser Ser Arg Pro Leu
225 230 235 240
Arg Val Leu Thr Ala Val Val Ala Ser Phe Phe Ile Cys Trp Phe Pro
245 250 255
Phe Gln Leu Val Ala Leu Leu Gly Thr Val Trp Leu Lys Glu Met Leu
260 265 270
Phe Tyr Gly Lys Tyr Lys Ile Ile Asp Ile Leu Val Asn Pro Thr Ser
275 280 285
Ser Leu Ala Phe Phe Asn Ser Cys Leu Asn Pro Met Leu Tyr Val Phe
290 295 300
Val Gly Gln Asp Phe Arg Glu Arg Leu Ile His Ser Leu Pro Thr Ser
305 310 315 320
Leu Glu Arg Ala Leu Ser Glu Asp Ser Ala Pro Thr Asn Asp Thr Ala
325 330 335
Ala Asn Ser Ala Ser Pro Pro Ala Glu Thr Glu Leu Gln Ala Met
340 345 350

<210> 2
<211> 1053
<212> DNA
<213> Human
<400> 2
atggaacac acttccac tccctgaat gaataaag aagtgccta tgaatgct 60
ggctacactg ttctgcggaat cctccatgg atggtgttg ggggcacatt tgcctcggg 120
gtcctgggca atggccttgt gattcgggtg gctggatcc ggaagacag cacaatcac 180
accatcgtt acctgaacct gggcctggct gactttcct tcaaggccac attacatc 240
ctcatgtct ccatggccat gggagaanaa tggccttgg gctggctcct gtgaagta 300
attcacatcg tggtagaact caaccttct ggaagtgtct tcttgatgg ttcatgca 360
ctggaacgct gcaattgtgt cctgcacaa gtctgggccc agaaccacg caatgtagt 420
ctggccatga aggtgatcgt cggaccttgg attctgtc tagtccctaac ctggcagtt 480
ttccctttt tgactacagt aactatcca aatgggaca catactgac ttcaactt 540
gcatactgg atggacccc tgaagagagg ctgaagtgag ccaattacat gctagacgc 600
agaaggatla tccggttgt catggcctt agcttgcaga tgtccatgt tggcattcgc 660
tatgggctca ttgacagcaa gattccacaa aagggcatag ttaattcag ccgtccctta 720
cgggtccctca ctgctgtgtgt ggcctccttc ttcaatcgtt ggtttccct tcaactggt 780
ggccttcctgg gcaaccgtctg gctcaagag atgttgtct atggcaaga caaatcat 840
gacatcctgg ttaaccacac gaggctccctg gctcttca acagctgct caaccatg 900
cttaccgtct ttgtgggcca agacttcga gaggagctga tccatccct gccaccagt 960
ctggaagagg cccgtctga ggaatcagcc ccaactaatg acacggctgc caattcgtct 1020
tcactcctg cagagactga gttacagca atg 1053
<210> 3
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>

<223> Primer

<400> 3

taccctaac gtgcaaggt agcatg 26

<210> 4

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 4

gtggacctat tgggtgtgt ttgcattg 29

<210> 5

<211> 72

<212> DNA

<213> Human

<400> 5

atggctcgac gaggttcag ctgtctctta ctltcaacca ctgcacatga cctggccgtg 60

aagaggcggc ca 72

<210> 6

<211> 24

<212> PRT

<213> Human

<400> 6

Met Ala Arg Arg Gly Phe Ser Cys Leu Leu Ser Thr Thr Ala Thr

1 5 10 15

Asp Leu Pro Val Lys Arg Arg Thr

20

<210> 7

<211> 75

<212> DNA

<213> Human

<400> 7

atggctcac gaggttcag ctgtctctta ctltcaacca gtgaattga cctggccgtg 60

aagaggcggc cataa 75

<210> 8

<211> 145

<212> DNA

<213> Human

<400> 8

atcacttgtt ccttaaatag ggaattgtat gaatgctcg acgaggtttc agctgtctct 60

tacttcaac cactgcaact gacctggccg tgaagagcgc gacataatac aacaaagcga 120

gaagaccata tggagcttca atta 145

<210> 9

<211> 6

<212> PRT

<213> Human

<400> 9

Pro Val Lys Arg Arg Thr

1 5

<210> 10

<211> 18

<212> DNA

<213> Human

<400> 10

cccgtgaaga ggcggcca 18

<210> 11

<211> 24
<212> PRT
<213> Human
<400> 11
Met Ala Pro Arg Gly Phe Ser Cys Leu Leu Leu Thr Ser Glu Ile
1 5 10 15
Asp Leu Pro Val Lys Arg Arg Ala
20 24
<210> 12
<211> 24
<212> PRT
<213> Human
<400> 12
Met Ala Pro Arg Gly Phe Ser Cys Leu Leu Leu Thr Gly Glu Ile
1 5 10 15
Asp Leu Pro Val Lys Arg Arg Ala
20 24
<210> 13
<211> 21
<212> PRT
<213> Human
<400> 13
Met Ala Pro Arg Gly Phe Ser Cys Leu Leu Leu Thr Ser Glu Ile
1 5 10 15
Asp Leu Pro Val Lys
20 21
<210> 14
<211> 38

<212> PRT
<213> Rat
<400> 14
Met Ala Lys Arg Gly Phe Asn Cys Leu Leu Leu Ser Ile Ser Glu Ile
5 10 15
Asp Leu Pro Val Lys Arg Leu Glu Ser Pro Asn Lys Thr Arg Arg Pro
20 25 30
Tyr Gly Ala Ser Ile Tyr
35 38
<210> 15
<211> 24
<212> PRT
<213> Rat
<400> 15
Met Ala Lys Arg Gly Phe Asn Cys Leu Leu Leu Ser Ile Ser Glu Ile
5 10 15
Asp Leu Pro Val Lys Arg Leu Glu
20 24
<210> 16
<211> 21
<212> PRT
<213> Rat
<400> 16
Met Ala Lys Arg Gly Phe Asn Cys Leu Leu Leu Ser Ile Ser Glu Ile
5 10 15
Asp Leu Pro Val Lys
20 21
<210> 17

<211> 351
 <212> PRT
 <213> Rat
 <400> 17
 Met Glu Ala Asn Tyr Ser Ile Pro Leu Asn Val Ser Glu Val Val Val
 5 10 15
 Tyr Asp Ser Thr Ile Ser Arg Val Leu Trp Ile Leu Thr Met Val Val
 20 25 30
 Leu Ser Ile Thr Phe Val Leu Gly Val Leu Gly Asn Gly Leu Val Ile
 35 40 45
 Trp Val Ala Gly Phe Arg Met Val His Thr Val Thr Thr Cys Phe
 50 55 60
 Leu Asn Leu Ala Leu Ala Asp Phe Ser Phe Thr Val Thr Leu Pro Phe
 65 70 75 80
 Phe Val Ile Ser Ile Ala Met Lys Lys Lys Trp Pro Phe Gly Trp Phe
 85 90 95
 Leu Cys Lys Leu Val His Ile Val Val Asp Ile Asn Leu Phe Gly Ser
 100 105 110
 Val Phe Leu Ile Ala Leu Ile Ala Leu Asp Arg Cys Ile Cys Val Leu
 115 120 125
 His Pro Val Trp Ala Gln Asn His Arg Thr Val Ser Leu Ala Arg Lys
 130 135 140
 Val Val Val Gly Pro Trp Ile Leu Ala Leu Ile Leu Thr Leu Pro Ile
 145 150 155 160
 Phe Ile Phe Met Thr Thr Val Arg Ile Pro Gly Gly Asn Val Tyr Cys
 165 170 175
 Thr Phe Asn Phe Ala Ser Trp Gly Asn Thr Ala Glu Glu Leu Leu Asn
 180 185 190

Ile Ala Asn Thr Phe Val Thr Val Arg Gly Ser Ile Arg Phe Ile Ile
 195 200 205
 Gly Phe Ile Met Pro Met Ser Ile Val Ala Ile Cys Tyr Gly Leu Ile
 210 215 220
 Ala Val Lys Ile His Arg Arg Ala Leu Val Asn Ser Ser Arg Pro Leu
 225 230 235 240
 Arg Val Leu Thr Ala Val Val Ala Ser Phe Phe Ile Cys Trp Phe Pro
 245 250 255
 Phe Gln Leu Val Ala Leu Leu Gly Thr Ile Trp Phe Lys Glu Ser Leu
 260 265 270
 Phe Ser Gly Arg Tyr Lys Ile Leu Asp Met Trp Val His Pro Thr Ser
 275 280 285
 Ser Leu Ala Tyr Phe Asn Ser Cys Leu Asn Pro Met Leu Tyr Ala Phe
 290 295 300
 Met Gly Gln Asp Phe His Glu Arg Leu Ile His Ser Leu Pro Ser Ser
 305 310 315 320
 Leu Glu Arg Ala Leu Ser Glu Asp Ser Gly Gln Thr Ser Asp Thr Gly
 325 330 335
 Ile Ser Ser Ala Leu Pro Pro Val Asn Ile Asp Ile Lys Ala Ile
 340 345 350
 <210> 18
 <211> 1053
 <212> DNA
 <213> Rat
 <400> 18
 atggaagca actattcat ccctctgaat gatacagaag tggttgtccta tgaattcacc 60
 atccacagag ttltgtggat cctcacaaatg gtgtgttctct ccatcaccit tgtcctgggt 120
 gtctgggta atggactagt gatctgggta gctggattcc ggaagtacaa cactgtcacc 180

actaacgtgt ttctgaatct agctttggct gacttctct tcacagtac tctaacatc 240
tttgtaactc caattgtcat gaaagaaaa tggccttttg gatgttctc gtgtaaata 300
gttcacattg tagtagacat aaaccttct ggaagtgtc tcttgattgc tttaattgc 360
ttggaccgtc gcatlttgtt cctgacatca gtctggctc agaaccaccg cactgtgagc 420
ctggctagga aggttggtgt tgggcccgtg atttagctc tgattctac ttggccatt 480
tttatctca tgcctacagt tagaattcct ggaaggcaatg tgtactgtac attcaattc 540
gcacccctggg gtacacatgc tgaagaaacta ttgaacatag ctacacctt tgaacagtt 600
agggggagca tcaagttcat taatggctc ataatgctca tgtccattgt tgcacatgc 660
taaggactca tccctgtcaa gatccacaga agagccattg ttaattccag ccgtccatca 720
agaagctcta cagcagttgt ggccttcctc ttatctgtt ggtttccctt tcaactgggtg 780
ggcctttag gtacaaatcgt gtttaagag tcatgttta gtggctgta caaatctt 840
gacatgtggg ttacccaac cagctcattg gcttactca atagtctcct caatcaatg 900
ctctatgctt tcatgggcca ggaatttcat gaaagactga ttcatctcct gcttccagt 960
ctggagagag cccttgatga ggaacttggc caaaccaatg ataacagcat cagttctgct 1020
ttactctctg taacataga tataaagca ata 1053

<210> 19

<211> 351

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 19

Met Glu Ser Asn Tyr Ser Ile His Leu Asn Gly Ser Glu Val Val Val

5 10 15

Tyr Asp Ser Thr Ile Ser Arg Val Leu Trp Ile Leu Ser Met Val Val

20 25 30

Val Ser Ile Thr Phe Phe Leu Gly Val Leu Gly Asn Gly Leu Val Ile

35 40 45

Trp Val Ala Gly Phe Arg Met Pro His Thr Val Thr Thr Ile Trp Tyr

50 55 60

Leu Asn Leu Ala Leu Ala Asp Phe Ser Phe Thr Ala Thr Leu Pro Phe
65 70 75 80
Leu Leu Val Glu Met Ala Met Lys Glu Lys Trp Pro Phe Gly Trp Phe
85 90 95
Leu Cys Lys Leu Val His Ile Val Val Asp Val Asn Leu Phe Gly Ser
100 105 110
Val Phe Leu Ile Ala Leu Ile Ala Leu Asp Arg Cys Ile Cys Val Leu
115 120 125
His Pro Val Trp Ala Glu Asn His Arg Thr Val Ser Leu Ala Arg Lys
130 135 140
Val Val Val Gly Pro Trp Ile Phe Ala Leu Ile Leu Thr Leu Pro Ile
145 150 155 160
Phe Ile Phe Leu Thr Thr Val Arg Ile Pro Gly Gly Asp Val Tyr Cys
165 170 175
Thr Phe Asn Phe Gly Ser Trp Ala Glu Thr Asp Glu Glu Lys Leu Asn
180 185 190
Thr Ala Ile Thr Phe Val Thr Thr Arg Gly Ile Ile Arg Phe Leu Ile
195 200 205
Gly Phe Ser Met Pro Met Ser Ile Val Ala Val Cys Tyr Gly Leu Ile
210 215 220
Ala Val Lys Ile Asn Arg Arg Asn Leu Val Asn Ser Ser Arg Pro Leu
225 230 235 240
Arg Val Leu Thr Thr Ala Val Val Ala Ser Phe Phe Ile Cys Trp Phe Pro
245 250 255
Phe Glu Leu Val Ala Leu Leu Gly Thr Val Trp Phe Lys Glu Thr Leu
260 265 270
Leu Ser Gly Ser Tyr Lys Ile Leu Asp Met Phe Val Asn Pro Thr Ser
275 280 285

Ser Leu Ala Tyr Phe Asn Ser Cys Leu Asn Pro Met Leu Tyr Val Phe

290 295 300

Met Gly Gln Asp Phe Arg Glu Arg Phe Ile His Ser Leu Pro Tyr Ser

305 310 315 320

Leu Glu Arg Ala Leu Ser Glu Asp Ser Gly Gln Thr Ser Asp Ser Ser

325 330 335

Thr Ser Ser Thr Ser Pro Pro Ala Asp Ile Glu Leu Lys Ala Pro

340 345 350

<210> 20

<211> 1053

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 20

atggaatcaa actatccat ccatctgaat ggaatcagaag tgggtgtta tgattctacc 60
atccacagag ttctgttgat cctctcaatg gtggttgtct ccatcacttt ctctcttggt 120
gtgttgagga atggaatagt gatttgagga gcttgatccc ggaatgcaca caactgcacc 180
actatcgtgt atctgaact agcataggct gactttcctt tcacagcaac tctaccatc 240
ctctctgttg aatggctat gaaagaaaag tggccttgg gctgtgtcct gtgtaattta 300
gttcaaatlg tggtagatgt aaacctgttt ggaagtgtct tcttgatgac tctcatggcc 360
ttggaccgct gcaatttgtt tctgcaacca gctgggctc agaaccacgc caactgtgagc 420
ctggtagaga aggtgggtgt tgggcccctgg attttgctc tgattctcac ttggcccat 480
tttatcttct tgactactgt tagaatcctt ggaaggagtg tgtattgtac attcaacttt 540
ggaatcctggg ctcaaatcga tgaagaaaag ttgaacacag ctatcacttt tgaacaact 600
agaaggatca tcaagttcct tatlggttcc agcatgccca tgtcaattgt tgcgttttgc 660
tatggaatca ttgctgtcaa gatacaaga agaaaccttg ttaattccag ccgtctctta 720
cgagttccta cagcagttgt ggcctccttc ttatctgct ggttccctt tcagcttggg 780
ggccttttgg gcaacgtctg gtttaagag acaattgcta gtggttagta taaacttct 840
gacatgtttg ttaaccacaa aagctcatlg gcttactaca atagtgtct caatcagatg 900

ctctatgttt tcaatggcca ggaatttctt gagaatttta ttaattcctt gactatagt 960
cttgagagag cccatggatga ggaattcgtt caaacagatg attcaagcac caattctact 1020
tcacctctg cagacattga gttaaaggcc cca 1053

<210> 21

<211> 353

<212> PRT

<213> Human

<400> 21

Met Glu Thr Asn Phe Ser Ile Pro Leu Asn Glu Thr Glu Glu Val Leu

5 10 15

Pro Glu Pro Ala Gly His Thr Val Leu Trp Ile Phe Ser Leu Leu Val

20 25 30

His Gly Val Thr Phe Val Phe Gly Val Leu Gly Asn Gly Leu Val Ile

35 40 45

Trp Val Ala Gly Phe Arg Met Thr Arg Thr Val Asn Thr Ile Cys Tyr

50 55 60

Leu Asn Leu Ala Leu Ala Asp Phe Ser Phe Ser Ala Ile Leu Pro Phe

65 70 75 80

Arg Met Val Ser Val Ala Met Arg Glu Lys Trp Pro Phe Ala Ser Phe

85 90 95

Leu Cys Lys Leu Val His Val Met Ile Asp Ile Asn Leu Phe Val Ser

100 105 110

Val Tyr Leu Ile Thr Ile Ile Ala Leu Asp Arg Cys Ile Cys Val Leu

115 120 125

His Pro Ala Trp Ala Gln Asn His Arg Thr Met Ser Leu Ala Lys Arg

130 135 140

Val Met Thr Gly Leu Trp Ile Phe Thr Ile Val Leu Thr Leu Pro Asn

145 150 155 160

Phe Ile Phe Trp Thr Thr Ile Ser Thr Thr Asn Gly Asp Thr Tyr Cys
 165 170 175
 Ile Phe Asn Phe Ala Phe Trp Gly Asp Thr Ala Val Glu Arg Leu Asn
 180 185 190
 Val Phe Ile Thr Met Ala Lys Val Phe Leu Ile Leu His Phe Ile Ile
 195 200 205
 Gly Phe Thr Val Pro Met Ser Ile Ile Thr Val Cys Tyr Gly Ile Ile
 210 215 220
 Ala Ala Lys Ile His Arg Asn His Met Ile Lys Ser Ser Arg Pro Leu
 225 230 235 240
 Arg Val Phe Ala Ala Val Val Ala Ser Phe Phe Ile Cys Trp Phe Pro
 245 250 255
 Tyr Glu Leu Ile Gly Ile Leu Met Ala Val Trp Leu Lys Glu Met Leu
 260 265 270
 Leu Asn Gly Lys Tyr Lys Ile Ile Leu Val Leu Ile Asn Pro Thr Ser
 275 280 285
 Ser Leu Ala Phe Phe Asn Ser Cys Leu Asn Pro Ile Leu Tyr Val Phe
 290 295 300
 Met Gly Arg Asn Phe Gln Glu Arg Leu Ile Arg Ser Leu Pro Thr Ser
 305 310 315 320
 Leu Glu Arg Ala Leu Thr Glu Val Pro Asp Ser Ala Gln Thr Ser Asn
 325 330 335
 Thr His Thr Thr Ser Ala Ser Pro Pro Glu Glu Thr Glu Leu Gln Ala
 340 345 350
 Met
 <210> 22
 <211> 1059
 <212> DNA

<213> Human
 <400> 22
 atggaacca acttctcat tccctgaat gaactgagg aggtgtccc tgagctgct 60
 ggcacaccg ttctgtgat ctctcatg ctatgcacg gattacatt tgtctcggg 120
 gtctcggca atggcttgc gatcgggtg gcgtgattc gcatgcacg cacagtcac 180
 accatctgt acctgaacct ggcctagct gactctct tcatgtcat cctacattc 240
 cgaatgtct cagtcacat gaggagaana tggccttgg cgtcatctt atgtaagta 300
 gtcatgta tcatagacat caactggtt gtcatgtct acctgatac catcatgct 360
 ctggaccgt gtatttgt ctgtacaca gcctggggcc agaaccatg caecatgagt 420
 ctggccaaga ggtgatgac gggactctgg atttacca tagtccctac ctaccaaat 480
 ttcatcttct ggaactaat aagtactag aatggggaca catactgat ttcaactt 540
 gcatctggg gtgacactg tctagagag ttgacgtgt tcatlaccat ggccaaggic 600
 ttctgatcc tccacttcat tattgcttc acgtgtccta tgcatacat caacagctgc 660
 tatgggataa tgcctgcac aatcacaga aaccacata ttaaatcag ccgtcccta 720
 cgtgtcttcg ctgctgtgtt ggcctcttc ttcatctgt ggttcctta tgaactaat 780
 ggcattctaa tggcagctg gctcaagag atgttgtta atggcaata caaatcatt 840
 ctgtcctga ttaaccacac aagctcttg gctlltlla acagctgct caaccaat 900
 ctctagctt ttatgggtg taacttcaa gaagactga ttgccttt gccactagt 960
 ttggagaggg cctgactga ggtccctgac tcagccaga ccagcaaac acacacct 1020
 tctgctcac ctctgaggga gacggagta caagcaatg 1059
 <210> 23
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Primer
 <400> 23
 aacagctcga ccacatgga atccaactac tccatcactc tg 42

<210> 24
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Primer
<400> 24
cttcttagat catggggcct ttaacctat gtc 33
<210> 25
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Primer
<400> 25
atctggtag ctggatcgg gatg 24
<210> 26
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Primer
<400> 26
tcttcatga aagtcctggc ccatgaa 27
<210> 27
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer
<400> 27
aggaattcta actgtagtca tga 24
<210> 28
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Primer
<400> 28
acagtagag gtagcatcag gtc 24
<210> 29
<211> 43
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Primer
<400> 29
ataaagtcga ccaccatgga agccaactat tccatccctc tga 43
<210> 30
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Primer
<400> 30
aaatctagat catatgctt ttatatcatat gttaca 37

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/07501

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl. G01N33/53, G01N33/15

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl. G01N33/50-98, G01N33/15

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shunan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shunan Koho 1994-2003

Kokai Jitsuyo Shunan Koho 1971-2003 Jitsuyo Shunan Toroku Koho 1996-2003

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	G. G. YING, et al., "HUMANIN, A NEWLY IDENTIFIED NEUROPROTECTIVE FACTOR, USES THE G-PROTEIN COUPLED RECEPTOR PPR1 AS A FUNCTIONAL RECEPTOR" JOURNAL OF INTERFERON & CYTOKINE RESEARCH VOL. 22, SUPPLEMENT 1, (OCTOBER 2002), P. S-180	1-5, 13
P, A	WO 02/103018 A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 27 December, 2002 (27.12.02), (Family: none)	1-5, 13
A	WO 01/21787 A (Keio University), 29 March, 2001 (29.03.01), & EP 1221480 A	1-5, 13

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	T
"A" document defining the general state of the art which is not	T
considered to be of particular relevance	T
"E" earlier document not published on or after the international filing	X
date	X
"U" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is	Y
cited to establish the publication date of another citation or other	Y
special reason (as specified)	Y
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other	Y
means	Y
"P" document published prior to the international filing date but later	Y
than the priority date claimed	Y

Date of the actual completion of the international search
08 JULY, 2003 (08.07.03)Date of mailing of the international search report
29 JULY, 2003 (29.07.03)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/07501

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 14

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 14 pertains to methods for treatment of the human body by surgery or therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a) (1) of the PCT and Rule 39.1 (1v) of the Regulations under the PCT, to search.

2. ☒ Claims Nos.: 6-12, 15

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
(see extra sheet)

☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This international searching authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/07501

Continuation of Box No. I-2 of continuation of first sheet (1)

The above claims present no specific constitution as a compound or its salt capable of changing the binding properties or signal transduction of a G protein-coupled receptor protein having an amino acid sequence which is the same or substantially the same as an amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1, 17, 19 or 21 or its salt to a humanin-like peptide or its salt. No specific constitution thereof is stated in the description too.

Form PCT/ISA/210 (extra sheet) (July 1998)

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP03/07501

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. G01N33/53, G01N33/15

B. 調査を行った分野

調査を行った能力検査料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. G01N33/50-58, G01N33/15

従小検査料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2003年
日本国特許実用新案公報	1994-2003年
日本国実用新案特許公報	1996-2003年

調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用紙)
OSIS (OIALOC), WP1 (OIALOC)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名、及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	G. G. YING, et al. "HUMANIN, A NEWLY IDENTIFIED NEUROPROTECTIVE FACTOR, USES THE G-PROTEIN COUPLED RECEPTOR PPL1 AS A FUNCTIONAL RECEPTOR" JOURNAL OF INTERFERON & CYTOKINE RESEARCH VOL. 22, SUPPLEMENT 1, (OCTOBER 2002) P. S-180	1-5, 13
PA	WO 02/103018 A (武田薬品工業株式会社) 2002.12.27 (フタミリーなし)	1-5, 13

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「J」優先権主張に該特許を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、開示等に及ぼす文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

国際調査を完了した日 08.07.03

国際調査報告の発送日 29.07.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J/P)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (捺印のある職員)

山村 祥子

印

2J 9217

電話番号 03-3581-1101 内線 3251

様式PCT/ISA/210 (第2ページ) (1998年7月)

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP03/07501

C (続き) 関連すると認められる文献

引用文献の
カテゴリー*

引用文献名、及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示

関連する
請求の範囲の番号A WO 01/21787 A (学校法人慶應義塾) 2001.03.29
AEP 1221480 A

1-5, 13

様式PCT/ISA/210 (第2ページの続き) (1998年7月)

第1欄 請求の範囲の一部の要素がでないときの見解 (第1ページの2の続き)
出願8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 14 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、請求の範囲14は、人の身体の手術又は治療による処置方法に該当し、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。

2. ☒ 請求の範囲 6-12, 15 は、有意義な国際調査をすることができると所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、特別ページ参照。

☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第1欄 発明の非一性が欠如しているときの見解 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期限内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期限内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期限内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続き (1)) (1998年7月)

上記請求の範囲には、humanin類似ペプチドまたはその塩と配列番号1, 17, 19, 21で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性またはシグナル伝達を変化させる化合物またはその塩としての具体的な構成は何ら記載されていない。また、明細書内の記載においても具体的な構成は何ら明記されていない。